

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. Rolf F. Maier

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Charakterisierung und Quantifizierung
von Lymphozyten-Subpopulationen
bei Kindern und Jugendlichen
mit allergischen Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jana Dehne aus Mexiko-Stadt

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 25.04.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan

Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent

Herr Prof. Dr. R. Maier

1. Korreferent

Herr Prof. Dr. H. Garn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 1 -
I Einleitung	- 1 -
I-1 Die allergische Immunantwort und ihre Regulation	- 1 -
I-2 Charakterisierung und Funktion von humanen Lymphozyten-Subpopulationen	- 2 -
I-2.1 B-Zellen	- 2 -
I-2.2 T-Zellen	- 7 -
I-2.3 Dendritische Zellen	- 10 -
I-3 Spezifische allergische Erkrankungen	- 12 -
I-3.1 Allergisches Asthma bronchiale	- 12 -
I-3.2 Allergische Rhinokonjunktivitis	- 13 -
I-3.3 Atopische Dermatitis	- 13 -
I-3.4 Nahrungsmittelallergie	- 14 -
I-4 Fragestellung	- 15 -
II Material und Methoden	- 16 -
II-1 Studienaufbau	- 16 -
II-3 Probenverarbeitung und durchflusszytometrische Messungen	- 18 -
II-4 Material	- 19 -
II-5 Auswertung der Daten	- 21 -
III Ergebnisse	- 37 -
III-1 Patientenkollektiv und statistische Auswertung	- 37 -
III-3 Messergebnisse der Lymphozytenpopulationen bei Kindern ohne allergische Erkrankungen	- 39 -
III-4 Quantitativer Vergleich der Immunzell-Subpopulationen von Kindern mit und ohne allergischen Erkrankungen	- 41 -
III-5 Veränderte Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien	- 46 -
III-5.1 Gedächtnis-Th2-Zellen	- 46 -
III-5.2 Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen	- 48 -

III-5.3 Th17-Zellen	- 50 -
III-5.4 Dendritische Zellen	- 52 -
III-6 Analyse von Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit allergischem Asthma bronchiale	- 54 -
IV Diskussion	- 56 -
IV-1 Validität der experimentellen Studie	- 56 -
IV-2 Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen	- 57 -
IV-2.1 T-Zellpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Allergieformen	- 58 -
IV-2.2 Gedächtnis-Th2-Zellen	- 60 -
IV-2.3 Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen	- 60 -
IV-2.4 Th17-Zellen	- 61 -
IV-2.5 Myeloische dendritische Zellen Typ 2	- 62 -
IV-3 Stärken und Schwächen dieser Studie	- 63 -
IV-4 Ausblick	- 64 -
V Zusammenfassung	- 65 -
V.1 Summary	- 66 -
VI Publikationen	- 67 -
VII Literatur	- 68 -
VIII Anhang	- 80 -
VIII-1 Abkürzungen	- 80 -
VIII-3 Lebenslauf	- 81 -
VIII-4 Verzeichnis akademischer Lehrer	- 82 -
VIII-5 Danksagungen	- 83 -
VIII-6 Ehrenwörtliche Erklärung	- 84 -

I Einleitung

I-1 Die allergische Immunantwort und ihre Regulation

Allergische Erkrankungen werden durch eine fehlregulierte Immunreaktion verursacht [95, 108]. Die unkontrollierte und permanente Reaktion des Immunsystems auf exogene Antigene ohne Toleranzinduktion kennzeichnet die Pathogenese von Allergien bei Menschen mit entsprechender genetischer Disposition und Exposition. Da Immunreaktionen aus der konzertierten Interaktion verschiedener Immunzellen und ihrer Botenstoffe resultieren, ist die Kenntnis über Art, Funktion, Quantität und Relevanz der einzelnen Immunzellpopulationen von großer Bedeutung.

Seit über 20 Jahren beherrscht das Th1/Th2-Paradigma die wissenschaftliche Erforschung allergischer Erkrankungen [95]: Dabei werden zwei Zellpopulationen einander gegenübergestellt: Th1- und Th2-Zellen. Beide differenzieren sich aus CD4-positiven T-Zellen, unterscheiden sich jedoch sowohl in ihrer Zytokinproduktion und ihren Oberflächenmarkern, als auch in ihrer Funktion [141]. Durch die Exposition gegen intra- oder extrazelluläre Pathogene, sowie durch den Einfluss anderer beteiligter Immunzellen, werden Immunreaktionen mit mehr Th1- oder mehr Th2-Zellen gefördert [154]. Im Falle der allergischen Erkrankungen dominieren die Th2-Zellen. Diese fördern die Bildung von antigenspezifischem IgE sowie die Aktivierung und Proliferation von Immunzellen, welche die pathologische Immunreaktion verstärken [7].

Neue Forschungsergebnisse weisen jedoch auf eine deutlich komplexere Regulation der Immunantwort bei allergischen Erkrankungen hin. Ein ganzes Spektrum regulierender T-Zellen mit unterschiedlichen sezernierten Zytokinen beeinflusst die Aktivität und Proliferation von Th2-Zellen sowie die gesamte immunologische Reaktion [135]. Zudem werden auch dendritischen Zellen, B-Zellen und weiteren Immunzellen zunehmend regulierende Funktionen zugeschrieben. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit bekannte und aktuelle Immunzellpopulationen bei Kindern mit allergischen Erkrankungen untersucht werden.

I-2 Charakterisierung und Funktion von humanen Lymphozyten-Subpopulationen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lymphozyten-Subpopulationen werden in den folgenden Abschnitten im Hinblick auf ihre Entwicklung, Funktion und immunphänotypische Charakterisierung beschrieben.

I-2.1 B-Zellen

B-Zellen entwickeln sich aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark und reifen zunächst zu **Pro-B-Zellen** heran. Diese tragen neben dem Lymphozytenmarker CD45 auch den charakteristischen B-Zell-Marker CD19 und MHCII sowie CD38 auf ihrer Oberfläche und beginnen die Rearrangierung der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors (BZR). Bei den daraus entstehenden **Pre-B-Zellen** kommt neben anderen Antigenen das oberflächengebundene IgM als Marker hinzu. Die **unreife B-Zelle** wird vom Knochenmark in das Blut ausgeschwemmt. Nach Entwicklungsstand und Funktion können im Blut verschiedene B-Zell-Populationen unterschieden werden (s. Tabelle I-1). Dabei dient CD19 als universeller B-Zell-Marker, während CD27 selektiv auf reifen Gedächtniszellen zu finden ist [116]. **Transitionale B-Zellen** werden durch CD19, IgD, IgM und CD38 charakterisiert. Die **aktivierten, transitionalen B-Zellen** treten in die Marginalzonen oder follikulären Zentren der Germinalzonen der Lymphknoten und der Milz ein und expandieren dort nach positiver Selektion klonal zu Gedächtniszellen. Beim Menschen stellen **CD5-positive B1-Zellen** eine Zwischenstufe in der Entwicklung zwischen transitionalen und naiven B-Zellen dar [75]. Sie können, wie naive B-Zellen, Antigene binden und präsentieren, sowie zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen differenzieren. CD5-positive B-Zellen werden an unterschiedlichen Orten im menschlichen Körper gebildet und zirkulieren auch im peripheren Blut. CD5-positive B-Zellen stellen 11-49% der B-Zellen beim Erwachsenen dar [99]. Obwohl auch unreife und transitionale B-Zellen CD5 auf ihrer Oberfläche tragen können, so machen B1-Zellen doch den größten Teil der CD5-positiven B-Zellen aus (~87%). Sie scheinen eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass CD5-positive B-Zellen beim Menschen polyspezifische autoreaktive Antikörper gegen IgG und Einzelstrang-DNS bilden können [42],

21]. Durch die Produktion von IL-10 spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunreaktionen. So erhält IL-10 durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Lebensfähigkeit der B1-Zellen und ermöglicht andererseits die Hemmung überreaktiver B-Zellen [39]. Die T-Zell-induzierte Verminderung von CD5 während der B-Zell-Entwicklung fördert die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu reifen Plasmazellen.

Die **naive B-Zelle** trägt neben IgM auch IgD auf ihrer Oberfläche, ist jedoch CD27-negativ.

Marginalzonen-ähnliche B-Zellen tragen CD19 und IgM, wenig IgD und zusätzlich CD27 auf ihrer Oberfläche. Diese Population überschneidet sich mit manchmal in der Literatur beschriebenen doppelt positiven Gedächtnis-B-Zellen mit IgM- und IgD-Expression. Die gegenwärtige Diskussion um Gedächtnis-B-Zell-Populationen, die nur IgM oder nur IgD aufweisen, sowie IgM und IgD gleichermaßen tragen, ist noch nicht abgeschlossen.

Gedächtnis-B-Zellen werden durch die Oberflächenmarker CD19, CD27 und IgM oder IgD gekennzeichnet. Diese CD27-positiven Populationen müssen als Gedächtnis-B-Zell-Populationen betrachtet werden, die noch keinen Klassenwechsel bei ihrer Antikörperproduktion durchgemacht haben. Im Folgenden werden alle Gedächtnis-B-Zellen mit positiver CD27-Expression (CD19+CD27+) als **Gedächtnis-B-Zellen 1** bezeichnet, und solche mit IgD-Expression (CD19+CD27+IgD+) als **Gedächtnis-B-Zellen 2**. Gedächtnis-B-Zellen mit IgM-Expression alleine (CD19+CD27+IgM) heißen **ausschliesslich-IgM-Gedächtnis-B-Zellen** [149].

Klassengewechselte B-Gedächtniszellen werden durch CD19, IgM und CD27 ohne IgD charakterisiert. **Späte Gedächtniszellen** weisen CD27 und CD38 aber kein IgD und wenig IgM auf.

Auch die nächste Entwicklungsstufe der B-Zellen, die **Plasmablasten**, tragen CD38 als Marker, verlieren jedoch die oberflächengebundene IgM-Expression. Die enddifferenzierte **Plasmazelle** im Gewebe zeichnet sich durch die zusätzliche Expression von CD138 aus [94, 90].

Das Fehlen des Oberflächenmarkers CD21 auf B-Zellen ist charakteristisch für transitionale B-Zellen, Plasmablasten und CD21-negative B-Zellen [147]. Bei gesunden Menschen liegt ihre Zahl unter 20% der B-Zellen [146]. **CD21-negative B-Zellen** werden vermehrt bei Typ Ia CVID-Patienten (Common variable immune

deficiency) gefunden, bei denen ihre Anzahl mit der Splenomegalie korreliert [151]. Ihre natürliche Funktion beim Menschen ist letztlich noch nicht geklärt.

B-Zellen produzieren nicht nur Antikörper, sondern weisen auch bedeutende Antikörper-unabhängige Funktionen auf, welche die Regulation von Immunreaktionen beeinflussen. Sie können als Antigenpräsentierende Zellen effizient T-Zellen stimulieren [48] [73] und verstärken die Bildung von Gedächtnis-T-Helfer-Zellen um den Faktor 1000 im Mausmodell [79]. Sie können IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, GSCF, GMSCF, TNF α , TGF, VEGF, BMP6/7 und LT α ausschütten und können den Aufbau lymphatischer Organe verändern [115]. Sie aktivieren Dendritische Zellen und beeinflussen ihre Reifung und Lokalisation [43]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sie den Effekt von Dendritischen Zellen auf T-Zellen hemmen und deren Th1-Induktion durch IL-12 vermindern [71]. Sie aktivieren T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen und induzieren sowie verstärken sowohl Th1- als auch Th2-Differenzierungen. Sie können eine T-Zell-Anergie zur Toleranzbildung bewirken sowie die Aktivität von Th1- und Th17-Zellen hemmen [71]. Sie können die Bildung von Treg induzieren und ihre Funktion fördern oder hemmen, indem sie unterschiedliche Mengen von IL-10 und TGF β ausschütten. Außerdem können sie Anergie in Treg induzieren [104] [158]. Ihre Wirkung hängt von ihrer absoluten und relativen Häufigkeit sowie ihrer Aktivität ab. Insbesondere transitionale, Marginalzonen-ähnliche und anergische B-Zellen scheinen im Mausmodell durch die IL-10-Produktion pathologische Immunreaktionen wie bei der autoimmunen Arthritis oder autoimmunen Enzephalitis zu dämpfen [71] [89] [33]. Duddy et al. [30] konnten zeigen, dass auch beim Menschen IL-10 von B-Zellen produziert wird. IL-10 kann entscheidend die immunologische Reaktion bei allergischen Erkrankungen hemmen, und es besteht eine inverse Korrelation zwischen der IL-10-Konzentration und allergischen Immunreaktionen [47]. Entscheidend bei der Regulation der Immunreaktion ist die Balance zwischen den funktionalen B-Zell-Subpopulationen [85]. Durch ihre Antigenpräsentation gegenüber T-Helfer-Zellen beeinflussen sie effektiv die resultierende Spezifität in der Gedächtnis-T-Helfer-Zell-Population. Ihre Ausschüttung von chemotaktischen Faktoren begünstigt zudem die Einwanderung von Immunzellen in entzündetes Gewebe [85]. Bei allergischen Immunreaktionen ist die Spezifität und Aktivität der B-Zellen von Bedeutung, da sie für die Bildung der antigenspezifischen IgE-Antikörper

verantwortlich sind. Die gebildeten IgE-Antikörper ermöglichen die unmittelbare allergische Reaktion sowie die konsekutive Pathophysiologie. Eine Veränderung der B-Zell-Quantität und -Aktivität hätte somit unmittelbare Folgen für die Ausbildung der allergischen Immunreaktion [141].

Tabelle I-1: Spezifische Oberflächenmarker in der B-Zell-Entwicklung

	KNOCHENMARK			BLUT									GEWE- BE	
OBER- FLÄCHEN- MARKER	Hämato- poie- tische Stamm- zelle	Pro- B- Zelle	Pre- B- Zelle	Unreife B-Zelle	Transi- tionale B-Zelle	Prä- naive B- Zelle	Naive B- Zelle	Marginal- zonen- ähnliche B-Zelle	Gedächtnis-B- Zelle			Klassen- gewech- selte Ge- dächtnis- B-Zelle	Plas- ma- blast	Plasma- zelle
									DP	IgM	IgD			
CD34	x													
CD45	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CD19		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MHCII		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
mIgM			x	x	x	x	x	x	x	x				
mIgD					x	x	x	x	x		x			
CD27								x	x	x	x	x	x	x
CD38		x	x		x							x	x	x
CD5				x	x	x								
CD138													x	x

DP Doppelt positive Zellen mit IgM und IgD

I-2.2 T-Zellen

T-Zellen entstehen im Thymus aus Vorläuferzellen, die aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark hervorgegangen sind. Da die früheste T-Vorläuferzelle weder CD4 noch CD8 exprimiert, wird sie als doppelt-negative T-Zelle bezeichnet. Zusammen mit der Expression von CD3 entwickeln die Zellen entweder den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (TZR) oder den $\alpha\beta$ -TZR. Zellen mit **$\gamma\delta$ -TZR** bleiben weiter CD4 und CD8 negativ, weisen jedoch zusätzlich CD5 auf der Oberfläche auf. **$\alpha\beta$ -T-Zellen** dagegen beginnen zunächst, einen prä- $\alpha\beta$ -TZR mit einer provisorischen α -Kette zu bilden und exprimieren sowohl CD4 als auch CD8. Auf dieser Entwicklungsstufe werden die $\alpha\beta$ -T-Zellen positiv selektioniert, die erfolgreich einen MHC-Komplex binden können. Über 95% der Zellen dagegen, die nicht an MHC binden können, enden in der Apoptose. Im Zuge der folgenden negativen Selektion werden die T-Zellen, die zu stark an Antigene der eigenen Gewebe binden, ebenfalls durch Apoptose eliminiert. Bei den übrigen Zellen wird je nach Bindungseigenschaft CD4 oder CD8 als funktioneller Co-Rezeptor ausgewählt, so dass zwei unterschiedliche Zellpopulationen, **zytotoxische T-Zellen (CD8)** und **T-Helfer-Zellen (CD4)** entstehen [56].

Als Aktivitätsmarker bei T-Zellen gilt CD69, mit dessen Hilfe **aktivierte zytotoxische T-Zellen** bzw. **aktivierte T-Helfer-Zellen** charakterisiert werden können [106].

Analog zu den B-Zellen werden auch bei den T-Zellen naive und Gedächtniszellen unterschieden. Dabei dient CD45RA als Marker für **naive T-Zellen**, während CD45RO auf **Gedächtnis-T-Zellen** zu finden ist.

Der Oberflächenmarker CCR7 ermöglicht die Unterscheidung zwischen **Gedächtnis zentralen** und **Gedächtnis Effektor- T-Zellen**. CCR7-positive Gedächtnis-zentrale T-Zellen wandern in die Lymphknoten und sind für die Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen nach einem zweiten Antigenkontakt zuständig. Sie sezernieren IL-4, IL-5 und IFN γ . CCR7-negative Effektor T-Zellen sind Effektorzellen im Gewebe und Blut, die unmittelbar eine Immunreaktion auslösen und zytotoxisch aktiv werden können [112].

Die Population der T-Helfer-Zellen mit CD4 als universellem Marker lässt sich weiter unterteilen. So kann man naive T-Helfer-Zellen unterscheiden, die in ihrer

Entwicklung Kontakt zum Thymus hatten (**CD31-positiv**), von T-Helfer-Zellen, die diesen Kontakt nicht hatten (**CD31-negativ**). CD31-positive T-Zellen reifen im Thymus und bilden die Mehrheit der naiven T-Helfer-Zellen im Nabelschnurblut [64]. Sie stellen ein direktes Maß für die Thymusaktivität und -funktionalität dar und können als Hinweis für die Immunkompetenz gewertet werden. CD31-negative Zellen entwickeln sich aus CD31-positiven Zellen nach Selektion und Proliferation in sekundären lymphatischen Organen. Sie repräsentieren den konstanten Pool naiver T-Helfer-Zellen im peripheren Blut, auch wenn die Zellproliferation und Aktivität des Thymus im Laufe des Lebens nachlässt. Ihre antigenabhängige Proliferation mit Selektion und Restriktion des TZR-Repertoires ermöglicht nicht nur effektive immunologische Reaktionen gegenüber Pathogenen, sondern birgt auch das Risiko der Entwicklung und Proliferation autoreaktiver T-Helfer-Zellen in sich [64].

Die T-Helfer-Zell-Population kann in zwei Gruppen unterteilt werden; in Th1-Zellen und Th2-Zellen. **Th1-Zellen** wirken zytotoxisch und können Makrophagen rekrutieren. Sie sezernieren IL-2, IL-12, TNF- β , IFN γ und weisen eine verstärkte Expression der Oberflächenmarker CXCR3 und CCR6 auf ihrer Zelloberfläche auf [1]. Ihre Rolle liegt vor allem in der Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern, die sie zusammen mit der infizierten Zelle in direktem Zellkontakt zerstören können [160]. Es wurde auch von allergenspezifischen Th1-Zellen berichtet, die durch die Produktion von IFN γ die Entzündungsreaktion verstärken [139].

Th2-Zellen aktivieren Mastzellen, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten durch die Sekretion von IL-5, IL-13, GM-CSF und IL-9. Außerdem sezernieren Th2-Zellen auch IL-4, IL-6, IL-10, IL-25, IL-31 und IL-33 [127]. Diese Zytokine induzieren die Proliferation von Mastzellen, die Infiltration durch eosinophile Zellen, den Klassenwechsel zu IgE sowie die vermehrte Mukusproduktion und Hyperreagibilität der Atemwege. Th2-Zellen weisen als Oberflächenmarker eine verstärkte Expression von CCR3, CCR4, CCR8 und CCR6 auf [113] [27] [24]. Ihre Funktion besteht in der Verstärkung der humoralen Abwehr gegen extrazelluläre Krankheitserreger. Th2-Zellen induzieren durch die Ausschüttung von IL-4 und TGF β die Bildung von Th9-Zellen [140] und unterdrücken gleichzeitig die Differenzierung von Treg [28].

Auch bei den Th1- und Th2-Zellen werden Gedächtniszellpopulationen beschrieben [154].

Des Weiteren muss unter den T-Helfer-Zellen folgende spezielle Subpopulation berücksichtigt werden: **Regulatorische T-Zellen** (Treg) mit CD25 als Marker sowie fehlender Expression von CD127. Das Fehlen von CD127 scheint ein zuverlässiger Oberflächenmarker für regulatorische T-Zellen zu sein, die immunphänotypisch als CD4+CD25+CD127- -Zellen bezeichnet werden und selektiv den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren [122]. Treg sezernieren IL-2, IL-10, IFN γ und TGF β . Auch unter den regulatorischen T-Zellen konnten Gedächtniszellen nachgewiesen werden [134]. Sie sind in Thymus, Blut und sekundären Lymphorganen zu finden.

Regulatorische T-Zellen können unter anderem die Funktion von Th1-, Th2- und Th17-Zellen hemmen [5]. Außerdem können sie die Induktion der Bildung von Effektor-T-Zellen durch Dendritische Zellen verhindern. Sie hemmen auch die Bildung von antigenspezifischen IgE-Antikörpern durch B-Zellen und induzieren stattdessen die Bildung von IgG4 [5]. Tatsächlich supprimierend wirken vor allem CD45RO-positive CD4+CD25+-Zellen, die etwa 1-2% der T-Helfer-Zellen beim Erwachsenen ausmachen. Sie können T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen in direktem Zell-Zell-Kontakt hemmen [92], sezernieren jedoch auch regulatorisch IL-10 und TGF β . CD4+C25+-Zellen senken die Spiegel von IL-5 und IL-13 sowie insgesamt der Th2-typischen Zytokine [38]. CD4+C25+-Zellen hemmen die T-Zell-Proliferation bei Allergikern und sind auch bei Kindern nach Ablauf allergischen Erkrankungen vermehrt zu finden [58] [77]. Es wurde gezeigt, dass Kinder, die unter allergischer Rhinitis oder Asthma bronchiale litten, weniger CD4+C25+-Zellen aufweisen als gesunde Kinder [74]. Treg können auch B-Zellen in ihrer Aktivierung und Differenzierung hemmen [76]. Ebenso werden Makrophagen und dendritische Zellen, Natürliche Killer-Zellen und Natürliche Killer-T-Zellen durch Treg inhibiert [130] [105] [10].

Eine weitere spezielle T-Zell-Subpopulation stellen die Th17-Zellen dar:

Th17-Zellen mit CCR6 und CD161 als Oberflächenmarkern [26] [1] entwickeln sich, unter Wirkung von IL-1 β und IL-23, aus naiven Natürlichen Killer-T-Zellen-ähnlichen CD4-positiven T-Zellen, die auch im Nabelschnurblut nachgewiesen

wurden [26]. Während TGF β die Differenzierung zu Th17-Zellen hemmt [2], bewirkt IL-12 ihre Umdifferenzierung zu Th1-Zellen. Studien in der Maus zeigten jedoch, dass auch TGF β für die Differenzierung von Th17-Zellen benötigt wird [84]. Möglicherweise fördert TGF β die Th17-Differenzierung beim Menschen indirekt [114]. Weitere Studien ergaben Hinweise dafür, dass auch humane Th17-Zellen IL-6, IL-21, IL-22 und IL-23 produzieren könnten [142] [37] [100]. In der Maus spielt die Sekretion von IL-21 eine wichtige Rolle [102], denn IL-6 und IL-21 sind essentiell für die Th17-Entwicklung in der Maus [66]. Ohne IL-6 erfolgt stattdessen die Bildung von Treg. IL-21 kann im Zusammenhang mit anderen Signalen - in Abhängigkeit vom Reifegrad einer B-Zelle - sowohl Apoptose als auch Differenzierung zu Plasmazellen sowie Klassenwechsel der Immunglobuline in B-Zellen induzieren [65]. Th17-Zellen zeichnen sich zudem durch die Expression von ROR γ T, CD161, CD45RO, CCR6, IL23R, IL-17 und IL-26 aus [109].

Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von allergischen Immunreaktionen [18] [118]. Ihre Bedeutung bei der Entwicklung des allergischen Asthma bronchiale wurde durch ihren Nachweis in Lungengewebe, Sputum und Serum von erwachsenen Patienten mit Asthma bronchiale bestätigt [159]. Die Quantität von IL-17 scheint mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren [17]. Th17-Zellen ermöglichen durch die Sekretion von IL-17 die Rekrutierung von neutrophilen Zellen und scheinen zudem eine Rolle bei schwerem und steroidresistentem Asthma bronchiale zu spielen [25]. Insgesamt stellt die Charakterisierung, Differenzierung und Funktion von Th17-Zelle ein aktuelles Forschungsgebiet dar, in dem weitere Details zu ihrer pathogenetischen Funktion erwartet werden.

I-2.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen spielen als Antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle bei der Initiation und Regulation von Immunreaktionen [11]. Anhand von drei Oberflächenmarkern lassen sich zwei myeloische dendritische Zellpopulationen und eine plasmatische dendritische Zellpopulation unterscheiden [32]. Die beiden myeloischen dendritischen Zellarten (MDC) entstammen der myeloischen Zelllinie und unterscheiden sich in der Expression ihres Oberflächenantigens: MDC1 exprimiert BDCA1; MDC2 dagegen BDCA3 als selektiven

Oberflächenmarker. Die plasmatischen dendritischen Zellen (PDC) entstammen der lymphatischen Zelllinie und tragen BDCA 2 als spezifischen Oberflächenmarker [32].

Dendritische Zellen (DC) sind entscheidend an der Bildung und Aufrechterhaltung der allergisch-entzündlichen Immunreaktion beim Menschen [40] und im Asthma-Modell der Maus [138] beteiligt. So können aktivierte dendritische Zellen nach Stimulation mit TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*) eine Th2-dominierte Immunreaktion induzieren und aufrechterhalten [53] [128].

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass plasmatische dendritische Zellen eine Th1-dominierte Immunreaktion induzieren, während myeloische dendritische Zellen sowohl Th1- als auch Th2-dominierte Immunantworten induzieren können [70] [68]. Zusätzlich induzieren PDC nicht nur eine Th1-dominierte Immunreaktion, sondern verhindern auch die Aktivierung und Differenzierung von Th2-Zellen und können Toleranz induzieren [29]. Inzwischen hat sich herausgestellt, dass die Art der ausgebildeten Immunreaktion nicht ausschließlich von einer Subpopulation dendritischer Zellen abhängt, sondern dass sowohl PDC als auch MDC Th1-oder Th2-dominierte Immunreaktionen auslösen können [138] [20] [107]. Das Stadium der Immunreaktion und die daran beteiligte Zellgemeinschaft spielen eine entscheidende Rolle bei der resultierenden Immunantwort [72]. Die Aktivierung von Th2-Zellen durch MDC wird durch Antigenpräsentation, costimulatorische Moleküle und die Ausschüttung von Chemokinen, insbesondere CCL17 und CCL22, vermittelt [41]. Die Th2-Aktivierung hängt ausserdem von zusätzlichen Faktoren wie IL-10, TGF β , Prostaglandin E2 (PGE2) und Histamin ab. Die von Mastzellen ausgeschütteten Stoffe Histamin und PGE2 hemmen die Produktion von IL-12 in DC und verstärken die Th2-dominierte Immunreaktion [19] [51]. Eine hohe Ausschüttung von IL-12 durch DC führt zur verstärkten Proliferation von Th1-Zellen [87], wenig IL-12 dagegen zur Proliferation und Aktivierung von Th2-Zellen. Da sich plasmatische dendritische Zellen funktionell zu myeloischen dendritischen Zellen umdifferenzieren und damit die Richtung der Immunreaktion vollständig verändern können, sind die gebildeten Immunreaktionen von hoher Plastizität geprägt [161].

Andererseits können bestimmte DC durch die konstante niederschwellige Präsentation von Antigenen eine Toleranzbildung induzieren [83]. Unreife

dendritische Zellen können die Proliferation und Differenzierung regulatorisch wirkender T-Zellen unterstützen. Sie können T-Helfer-Zellen hemmen und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen sowie deren IL-10-Produktion induzieren [45]. Reife dendritische Zellen produzieren IL-10 und verringern bei T-Zellen die IL-4-Produktion [4].

Eine Immunreaktion hängt daher in hohem Maß von der Quantität, dem Reifegrad und der Aktivität der dendritischen Subpopulation ab.

I-3 Spezifische allergische Erkrankungen

I-3.1 Allergisches Asthma bronchiale

Die Prävalenz des Asthma bronchiale weist seit Jahren eine weltweit steigende Tendenz auf [129] [3] [86]. Die Symptomprävalenz beträgt zwischen 1% und 33%, und ist durch eine erhebliche geographische Varianz geprägt [143] [52]. In Deutschland beträgt die Prävalenz des klinischen Asthma bronchiale bei Kindern und Jugendlichen 4,1% [119].

Die klinische Ausprägung des Asthma bronchiale unter medikamentöser Therapie wird in drei Schweregrade eingeteilt: kontrolliertes Asthma bronchiale, teilweise kontrolliertes Asthma bronchiale und nicht kontrolliertes Asthma bronchiale. Die Schweregrade unterscheiden sich in der Häufigkeit und Schwere der Symptome, nächtlichen Symptomen, Aktivitätseinschränkungen, Lungenfunktion und erforderlicher Notfallmedikation [14].

Allergisches Asthma bronchiale (aAB) ist durch eine chronische Entzündung der Atemwege, reversible Obstruktion, Mukushypersekretion und den fibrotischen Umbau der Atemwege gekennzeichnet. Beim allergischen Asthma bronchiale liegt eine Th2-dominierte Immunreaktion mit hoher IgE-Produktion vor. Die Th1/Th2-Dysbalance wird unter anderem durch eine Verringerung der Th1-Zellen durch vermehrte Apoptose bewirkt [6] [8]. Auch Th9-Zellen [140] und Th17-Zellen wirken proinflammatorisch, letztere besonders durch die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten [80]. Antigen-spezifische dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunreaktion. So konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Treg die Entzündungsreaktion hemmen kann [60]. Lee et al [74] konnten eine geringere

Zahl der Treg bei Patienten mit aAB nachweisen, jedoch war in dieser Studie ihre Zahl bei Patienten mit schwerem aAB erhöht. Dabei korreliert die Zahl der Treg positiv mit dem IgE-Spiegel [74]. Auch Mészáros et al [91] wiesen weniger Treg bei Kindern mit aAB nach.

Insgesamt stellt das allergische Asthma bronchiale eine komplexe immunologische Erkrankung dar, welche eine erhebliche Krankheitslast in der Bevölkerung und insbesondere bei Kindern und Jugendlichen verursacht.

I-3.2 Allergische Rhinokonjunktivitis

Die allergische Rhinokonjunktivitis (AR) ist die häufigste allergische Erkrankung und eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter [97]. Die Prävalenz der saisonalen AR beträgt 10%, die der ganzjährigen AR 20% [126]. 60% der jungen erwachsenen Patienten mit Asthma bronchiale weisen eine AR auf. Zudem weisen Patienten mit AR ein achtfach höheres Risiko auf an Asthma bronchiale zu erkranken [16]. Die allergische Rhinokonjunktivitis ist durch eine typische Th2-gewichtete Immunreaktion mit Produktion antigenspezifischer IgE-Antikörper und hoher Aktivität von Eosinophilen Zellen mit konsekutiver Pathophysiologie gekennzeichnet [23].

Zellen, die in die Regulation der Immunreaktion eingreifen, sind unter anderem Th1-Zellen [131] und regulatorische T-Zellen. Kinder mit allergischer Rhinokonjunktivitis scheinen weniger Treg zu haben [156]. Lee et al [74] wiesen eine geringere Anzahl von Treg bei Kindern mit AR nach, jedoch wurde bei schwerer oder persistierender AR eine größere Zahl von Treg nachgewiesen. Auch Mészáros et al [91] zeigten, dass Kinder mit AR weniger CD4+CD25+-T-Zellen hatten, diese Zellen jedoch durch eine stärkere Foxp3-Expression gekennzeichnet waren. Zudem wurden aktuell Hinweise darauf gefunden, dass Kinder mit AR mehr Th17-Zellen aufweisen könnten [22].

I-3.3 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) stellt die häufigste Hauterkrankung bei Kindern mit einer Lebenszeitprävalenz von 10-20% dar [129]. Etwa 75% der Kinder mit

atopischer Dermatitis leiden auch unter einer allergischen Rhinokonjunktivitis, mehr als 50% der Kinder mit AD weisen auch ein allergisches Asthma bronchiale auf [78]. AD ist eine chronische Erkrankung der Haut, die häufig im frühen Kindesalter beginnt und durch schubweise Verläufe gekennzeichnet ist. Die Exposition gegenüber Antigenen an der Haut oder über die Blutbahn führt zu ihrer Aufnahme und Präsentation durch Dendritische Zellen, und ihre Bindung an spezifische IgE-Antikörper aus Mastzellen. Dadurch wird in der akuten Phase eine Th2-gewichtete Immunreaktion induziert und verstärkt [148]. In der chronischen Phase dagegen dominiert die Th1-gewichtete Immunreaktion, die wahrscheinlich durch Zytokine aus dendritischen Zellen und Keratinozyten induziert wird [49] [149].

I-3.4 Nahrungsmittelallergie

Die Prävalenz von Nahrungsmittelallergien beträgt bis zu 6% bei Kinder und 3-4% bei Erwachsenen [144]. Nahrungsmittelallergien werden durch eine fehlende Toleranz gegenüber harmlosen Bestandteilen der Nahrung verursacht. Bis zu 40% der Kinder mit atopischer Dermatitis weisen eine Nahrungsmittelallergie auf [124].

Nahrungsmittelallergien umfassen allergische Reaktionen bei Aufnahme von spezifischen Proteinen, deren Verlauf ebenso hochakut und lebensbedrohlich wie wenig symptomatisch und chronisch sein kann. Ursache dieser fehlenden Toleranz könnte unter anderem eine zu effektive Immunstimulation durch die simultane Antigenpräsentation an mehreren Lokalisationen im menschlichen Körper sein. So weisen Kinder mit atopischer Dermatitis häufiger Allergien gegenüber Erdnüssen auf, wenn sie mit Körpercremes Kontakt hatten, die ebenfalls Bestandteile von Erdnüssen wie Erdnussöl enthielten [69]. Die fehlende orale Toleranz wird ausserdem auf die unzureichende Kontrolle der Immunreaktion durch regulatorische T-Zellen zurückgeführt. Im Mausmodell konnte durch den Transfer antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen eine Hemmung der allergischen Reaktion erreicht werden [21]. Insbesondere sind dabei CD4⁺CD25⁺ Treg mit Foxp3-Expression an der Immunregulation beteiligt. Menschen mit Mutationen im Gen des Transkriptionsfaktors Foxp3 (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enethieropathie, X-linked = IPEX-Syndrom) haben weniger Treg und weisen schwerere Verläufe von

Nahrungsmittelallergien auf [133]. Treg können speziell Th1- und Th2-Reaktionen hemmen, und ihre Zahl und Funktionsfähigkeit könnte entscheidend für die Bildung der oralen Toleranz sein [58].

I-4 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war die Analyse und Quantifizierung von Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen im Vergleich zu Kindern und Jugendlichen ohne allergische Erkrankung. Hierbei sollten insbesondere folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Unterscheiden sich die B-Zell-Subpopulationen zwischen Kindern und Jugendlichen ohne und mit allergischen Erkrankungen?
- Verändert sich die relative Zusammensetzung der Th1- und Th2-Zellpopulationen, oder gibt es Unterschiede im Differenzierungsgrad der Th2-Zellen bei Kindern mit Allergien?
- Sind quantitative Differenzen von regulierenden T-Zellen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien zu messen?
- Wie könnte die quantitative Zusammensetzung der Subpopulationen dendritischer Zellen die Entwicklung der Immunreaktion bei Allergien beeinflussen?
- Gibt es weitere relevante Zellpopulationen im T-Zell- oder B-Zell-Kompartiment, deren Bedeutung bisher noch nicht erfasst wurden?
- Sind Unterschiede im Lymphozyten-Profil bei Kindern mit unterschiedlichen allergischen Erkrankungen zu finden?

II Material und Methoden

II-1 Studienaufbau

In dieser Fall-Kontroll-Studie wurden Blutproben von Kindern und Jugendlichen im Alter von 1 – 17 Jahren untersucht. Dabei wurden 31 Blutproben von Kindern und Jugendlichen mit nachgewiesenen allergischen Erkrankungen gesammelt. Als Kontrollen wurden 25 Blutproben von Kindern und Jugendlichen ohne allergische Erkrankung untersucht.

Die Blutproben wurden in der Tagesklinik und in der pulmonologischen Ambulanz der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Marburg nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis durch die Eltern im Rahmen von Routine-Blutentnahmen in einem Zeitraum von 1 Jahr gewonnen. Blutentnahmen allein zu Studienzwecken erfolgten nicht.

Die Studie war vorab von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg begutachtet und als ethisch vertretbar bewertet worden (Marburg Az 20/07 vom 23.8.2007).

II-2 Studienpopulation

Die Zuteilung der Kinder und Jugendlichen zur Gruppe der Patienten mit allergischen Erkrankungen (= Studiengruppe) bzw. der Patienten ohne allergische Erkrankungen (= Kontrollgruppe) wurde gemäß folgenden Kriterien vorgenommen:

Kinder und Jugendliche mit allergischen Erkrankungen (= Studiengruppe) wiesen mindestens eines der folgenden Einschlusskriterien auf:

- Allergisches Asthma bronchiale mit eindeutiger klinischer Symptomatik (= Dyspnoe und reversible obstruktive Ventilationsstörung) und mindestens einem der folgenden Hauptkriterium oder zwei der folgenden Nebenkriterien:

Hauptkriterien für Asthma bronchiale:

- Positive Familienanamnese für atopische Erkrankungen: allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis oder allergisches Asthma bei Verwandten ersten Grades
- Positive Eigenanamnese

- Sensibilisierung mit positivem Ergebnis im Hautpricktest (HI >0.6) oder positives Ergebnis im RAST auf mindestens einem Aeroallergen

Nebenkriterien für Asthma bronchiale:

- Eosinophilie im Blut: >5% eosinophile Granulozyten
 - Sensibilisierung: Positives Ergebnis im Hautpricktest (HI > 0.6) oder positives Ergebnis im RAST auf mindestens einem Nahrungsmittelallergen
-
- Atopische Dermatitis mit eindeutiger klinischer Symptomatik (= Juckreiz, typische Lokalisation, schubweiser Verlauf) und mindestens drei der folgenden Kriterien
 - Positive Familienanamnese für atopische Erkrankungen
 - Positive Eigenanamnese
 - Eosinophilie im Blut: >5% eosinophile Granulozyten
 - Sensibilisierung: Positives Ergebnis im Hautpricktest (HI > 0.6) oder positives Ergebnis im RAST auf mindestens einem Allergen
-
- Allergische Rhinokonjunktivitis mit eindeutiger klinischer Symptomatik (= Rhinorrhoe und Konjunktivitis) und mindestens drei der folgenden Kriterien
 - Positive Familienanamnese für atopische Erkrankungen
 - Atopische Dermatitis in der Vorgeschichte
 - Eosinophilie im Blut: > 5% eosinophile Granulozyten
 - Sensibilisierung mit positivem Ergebnis im Hautpricktest (HI > 0.6) oder positives Ergebnis im RAST auf mindestens ein Allergen

Bei Abwesenheit aller oben aufgeführten Kriterien wurden die Patienten der Kontrollgruppe zugeteilt. Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren außerdem: pulmonologische Krankheiten, akute Infekte (in den vergangenen zwei Wochen), Einnahme von Antibiotika (in den vergangenen zwei Wochen), Störungen des Immunsystems.

II-3 Probenverarbeitung und durchflusszytometrische Messungen

Die Blutproben mit einem Volumen von jeweils 2,5 ml wurden innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme verarbeitet. In diesem Zeitraum erfolgte die Reinigung, Färbung sowie Messung der Immunzellen im Durchflusszytometer.

II-3.1 Isolation der mononukleären Zellen aus dem Blut

Das EDTA-Blut wurde in einem Leukosep-Röhrchen auf 3 ml Lymphozyten-Trennungs-Lösung mit Ficoll geschichtet und 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Die Leukozytenfraktion wurde zweimal mit Waschlösung durch Zentrifugation bei 250 g gewaschen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

II-2.2 Färbung der Zellen

Die Zellen wurden in einem Volumen von 100 µl auf die verschiedenen Ansätze verteilt und mit den Antikörpern versetzt (s. Tabelle II-4). Die Ansätze wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und dann mit jeweils 2 ml FACS-Lysing Solution® versetzt. Nach weiteren 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Proben bei 250 g zentrifugiert und erneut mit 3 ml Waschlösung gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 500 µl Fixierungslösung aufgenommen und mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Zur Analyse der dendritischen Zellen wurden die Zellen auf 2 Ansätze verteilt und mit 10% autologem Serum versetzt. Nach Zugabe von 10 µl BDCA-Mischung in den Messansatz, 10 µl Kontroll-Mischung in den Kontrollansatz sowie 5 µl Lösung zur Markierung toter Zellen in beide Ansätze wurden die Proben 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden einmal mit 4 ml Waschlösung gewaschen und 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 300 µl Waschlösung mit 150 µl Fixierungslösung und 5 µl Lösung zur Markierung der toten Zellen resuspendiert.

II-3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen

Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur® der Firma Becton, Dickinson and Company. Es ermöglicht neben der Detektion von Größe und Granularität der Zellen die simultane Messung von 4 verschiedenen Fluoreszenzen. Nach der Kompensation der Einzelfärbungen wurden von jedem Ansatz 30.000 Lymphozyten analysiert. Zur Analyse der dendritischen Zellen wurden 500.000 Zellen ausgewertet.

II-4 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper, Reagenzien und Laborgeräte tabellarisch aufgeführt.

Tabelle II-4.1: Verwendete Antikörper, Immunglobulinklasse, klonaler Ursprung, Konjugat und Hersteller bzw. Vertreiber

ANTIGEN-SPEZIFITÄT	ANTIKÖRPER	FLUORO-CHROM	KLON	FIRMA
CD3	Maus-IgG2a monoklonal	FITC	HIT3	BD Biosciences
CD4	Maus-IgG1 monoklonal	PerCP	SK3	BD Biosciences
CD5	Maus-IgG1 monoklonal	APC	UCHT2	BD Biosciences
CD8	Maus-IgG1 monoklonal	PE	RPA-T8	BD Biosciences
CD8	Maus-IgG1 monoklonal	PerCP	SK1	BD Biosciences
CD16	Maus-IgG1 monoklonal	PerCP	3G8	Biozol
CD19	Maus-IgG1 monoklonal	FITC	HIB19	BD Biosciences
CD19	Maus-IgG1 monoklonal	PE	SJ25C1	BD Biosciences
CD19	Maus-IgG1 monoklonal	APC	SJ25C1	BD Biosciences
CD21	Maus-IgG1 monoklonal	APC	B-ly4	BD Biosciences
CD25	Maus-IgG1 monoklonal	PE	M-A251	BD Biosciences
CD27	Maus-IgG1 monoklonal	FITC	M-T271	BD Biosciences
CD27	Maus-IgG1 monoklonal	PE	M-T271	BD Biosciences
CD31	Maus-IgG1 monoklonal	PE	WM59	Biozol
CD38	Maus-IgG1 monoklonal	PE	HIT2	BD Biosciences
CD38	Maus-IgG1 monoklonal	APC	HIT2	BD Biosciences
CD45RA	Maus-IgG2b monoklonal	APC	T6D11	Miltenyi
CD45R0	Maus-IgG2a monoklonal	PE	UCHL1	Biozol
CD56	Maus-IgG1 monoklonal	APC	B159	BD Biosciences

ANTIGEN-SPEZIFITÄT	ANTIKÖRPER	FLUORO-CHROM	KLON	FIRMA
CD69	Maus-IgG1 monoklonal	APC	FN50	Biozol
CD127	Maus-IgG1 monoklonal	Alexa Fluor 647	HIL-7R-M21	BD Biosciences
CD161	Maus-IgG1 monoklonal	PE	DX12	BD Biosciences
CCR4	Maus-IgG1 monoklonal	PE	1G1	BD Biosciences
CCR6/CD196	Maus-IgG2b monoklonal	Alexa Fluor 647	TG7/CCR6	Biozol
CCR7/CD197	Ratte-IgG2a monoklonal	PE	3D12	BD Biosciences
CXCR3/CD183	Maus-IgG1 monoklonal	PE	1C6/CXR3	BD Biosciences
CRTH2/CD294	Ratte-IgG2a monoklonal	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences
NKp46	Maus-IgG1 monoklonal	PE	9E2/Nkp46	BD Biosciences
HLADR	Maus-IgG2b monoklonal	PE	TU36	BD Biosciences
TZRαβ	Maus-IgM monoklonal	FITC	T10B9.1A-31	BD Biosciences
TZRγδ	Maus-IgG1 monoklonal	PE	B1	BD Biosciences
IgD	Maus-IgG2a monoklonal	FITC	IA6-2	BD Biosciences
IgM	Maus-IgG1 monoklonal	PerCP-Cy5	MHM-88	Biozol

Alle Antikörper waren in PBS mit 0.2% BSA und bis zu 0.09% NaN₃ gelöst.

Tabelle II-4.2: Bestandteile des Anwendungspakets zur Quantifizierung dendritischer Zellen (Blood Dendritic Cell Enumeration kit) der Firma Miltenyi

ANTIGEN-SPEZIFITÄT	ANTIKÖRPER	FLUORO-CHROM	KLON		
BDCA1	Maus-IgG2a monoklonal	PE	AD5-8E7	BDCA-Mischung	
BDCA2	Maus-IgG1 monoklonal	FITC	AC144		
BDCA3	Maus-IgG1 monoklonal	APC	AD5-14H12		
CD14	Maus-IgG2a monoklonal	PE Cy5	k.A.		
CD19	Maus-IgG1 monoklonal	PE Cy5	k.A.		
anti-Maus-IgG1	Maus-IgG1 monoklonal	FITC	k.A.		Kontroll-Mischung
anti-Maus-IgG2	Maus-IgG2a monoklonal	PE	k.A.		
anti-Maus-IgG1	Maus-IgG1 monoklonal	APC	k.A.		

Alle Antikörper waren in PBS mit 0,05% NaN₃ und 0,1% Gelatine gelöst.

Tabelle II-4.3: Verwendete Reagenzien, Inhaltsstoffe und Hersteller bzw. Vertreiber

MATERIAL	INHALTSSTOFFE	FIRMA
Leucosep-Röhrchen	14 ml mit Trennungsscheibe	Greiner bio-one
Lymphozyten Trennungs-Lösung LSM 1077	Ficoll	PAA Laboratories GmbH
Waschlösung (Cell wash)	NaCl, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , NaN ₃ , pH 7,2	BD Biosciences
Fixierungslösung IOTest3	Formaldehyd	Beckmann Coulter
Lösung zum Lysieren (FACS Lysing solution)	k.A.	Becton Dickinson
Lösung zur Markierung toter Zellen (Dead Cell Discriminator)	Fluoreszenzfarbstoff in PBS	Miltenyi
Fixierungslösung (Fix solution)	3,7% Formaldehyd in PBS	Miltenyi
Lösung zur Fixierung der markierten toten Zellen (Discriminator Stop Reagent)	Desoxyribonukleinsäure in 10 mM TRIS (Trishydroxymethylaminomethan), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8	Miltenyi
PBS (posphate buffered saline)	NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ OPO ₄	PAA Laboratories GmbH

Tabelle II-4.4: Verwendete Laborgeräte

GERÄT	NAME	FIRMA
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Durchflussszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences

II-5 Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software von Becton Dickinson and Company. Alle Ansätze wurden zunächst mit Hilfe des physikalischen Gates R1 im FSC-SSC-Scatter auf Lymphozyten eingegrenzt. Die anschliessenden Auswertungs-Strategien sind in nachfolgender Tabelle II-5 dargestellt.

Tabelle II-5: Auswertungs-Strategien der einzelnen Ansätze

ANSATZ	GATE	GATE		
B-Zellen 1	CD19	CD27	IgM	IgD
B-Zellen 2	CD19	CD38	IgM	CD21
B-Zellen 3	CD27	CD19	IgM	CD38
B1-Zellen	IgM	MHC II	CD19	CD5
Tαβ-Zellen	TZRαβ	CD4	CD8	CD69
Tγδ-Zellen	CD3		TZRγδ	CD5
T-Zellen 1	CD3	CD4	CCR7	CD45RA
T-Zellen 2	CD3	CD8	CCR7	CD45RA
CD4+Zellen	CD3	CD4	CD31	CD45RA
Th1-Zellen	CD3	CD4	CXCR3	CCR6
Th2-Zellen	CD3	CD4	CCR4	CRTH2
Gedächtnis-Th1	CD3	CD4	CXCR3	CD45RA
Gedächtnis-Th2	CD3	CD4	CD45RO	CRTH2
Regulatorische T-Zellen	CD3	CD4	CD25	CD127
Th17-Zellen	CD3	CD4	CD161	CCR6
Natürliche Killer-Zellen	CD3	NKp46	CD16	CD56
Dendritische Zellen	CD14CD19	BDCA1	BDCA2	BDCA3
Dendritische Zell-Kontrolle	CD14CD19	Maus IgG2	Maus IgG1	Maus IgG1

Lymphozyten-Gate

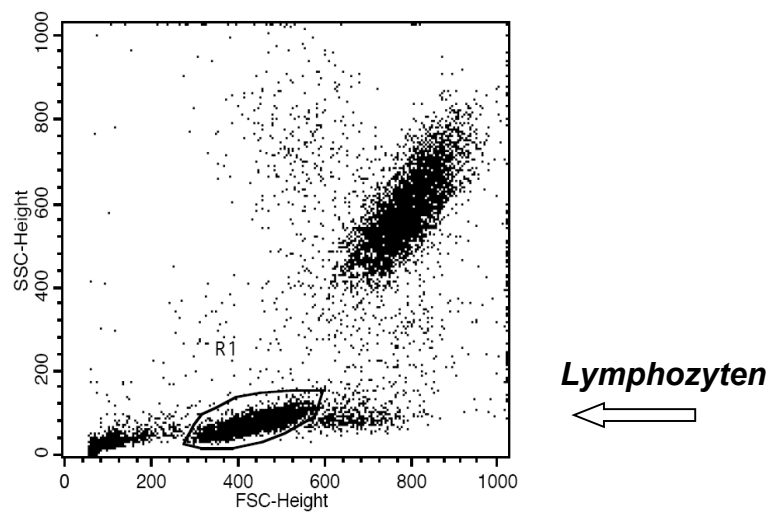


Abbildung II-5.1: Lymphozyten-Gate

B-Zellen: Gate CD45+CD19+

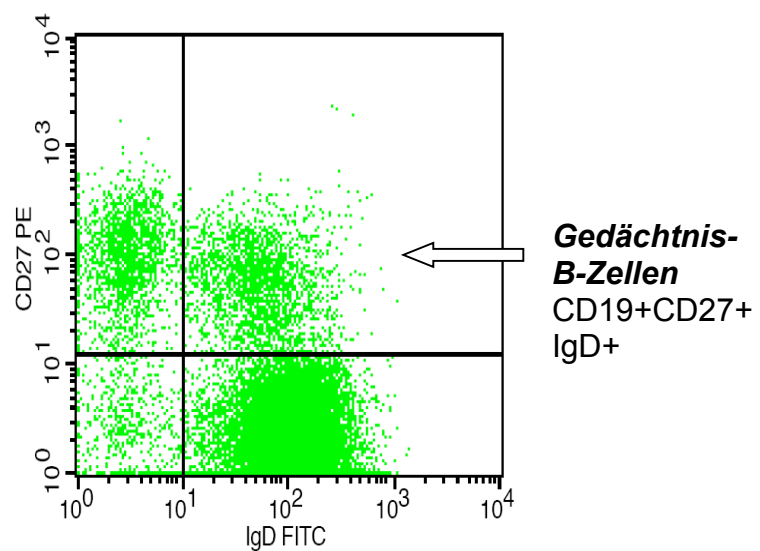


Abbildung II-5.2: Gedächtnis-B-Zellen

B-Zellen: Gate CD45+CD19+CD27-

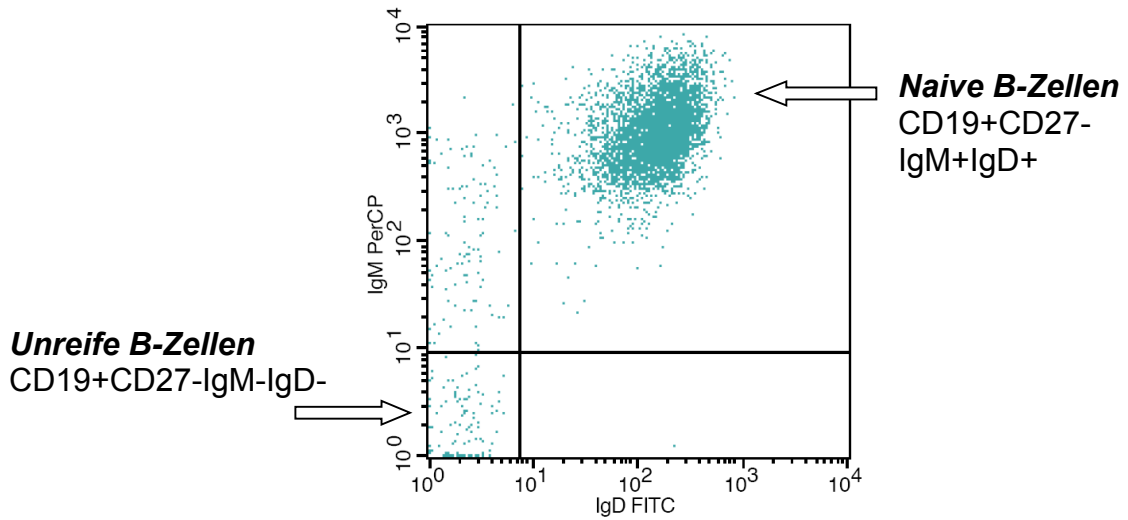


Abbildung II-5.3: Unreife und naive B-Zellen

B-Zellen: Gate CD45+CD19+CD27+

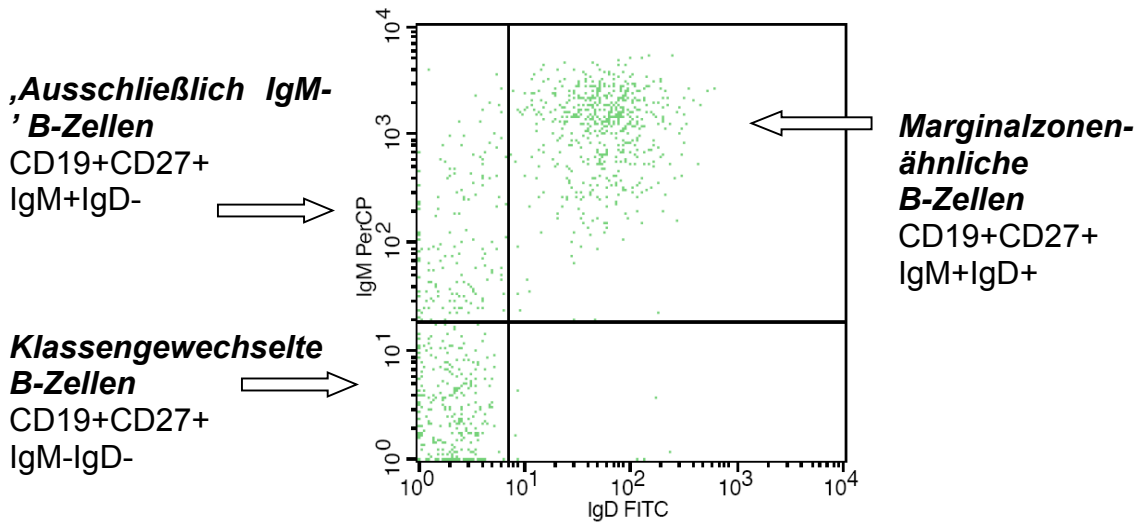
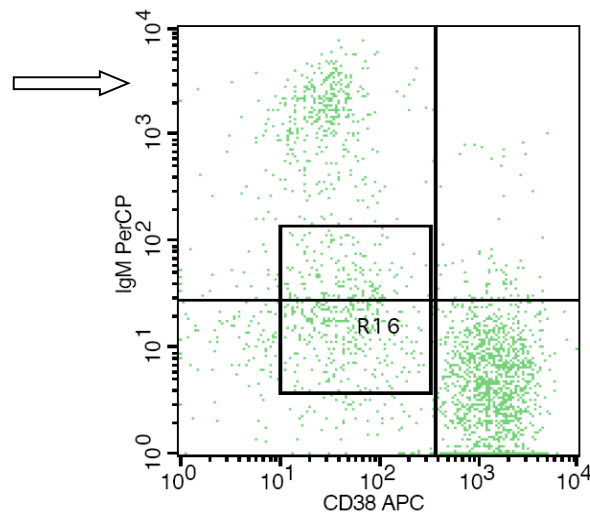


Abbildung II-5.4: „Ausschließlich IgM-“, Klassengewechselte und Marginalzonen-ähnliche Gedächtnis-B-Zellen

B-Zellen: Gate CD45+CD19+CD27+

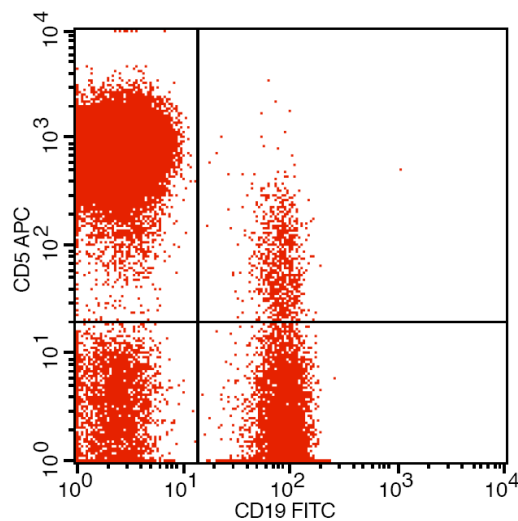
**Transitionale
B-Zellen**
CD19+CD27+
IgM+CD38+



Plasmablasten
CD19+CD27+
IgM-CD38++

Abbildung II-5.5: Transitionale B-Zellen und Plasmablasten

B-Zellen: Gate CD45+



B1-Zellen
CD19+CD5+

B2-Zellen
CD19+CD5-

Abbildung II-5.6: B1- und B2-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+

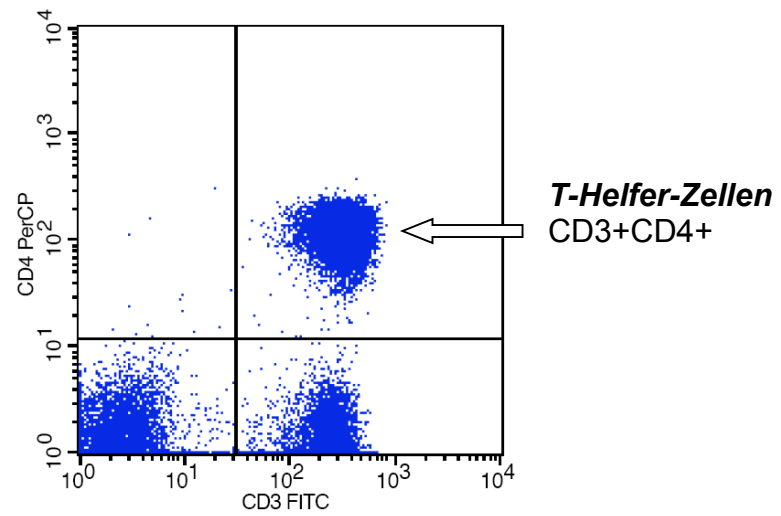


Abbildung II-5.7: T-Helfer-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+

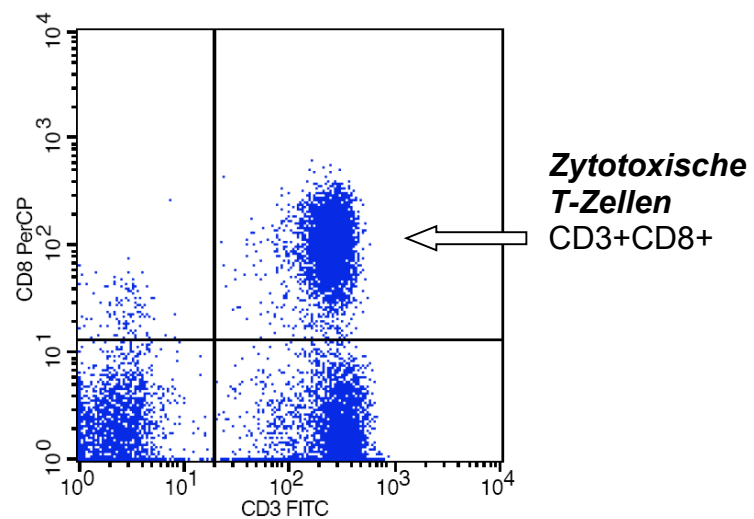


Abbildung II-5.8: Zytotoxische T-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+TZRαβ+

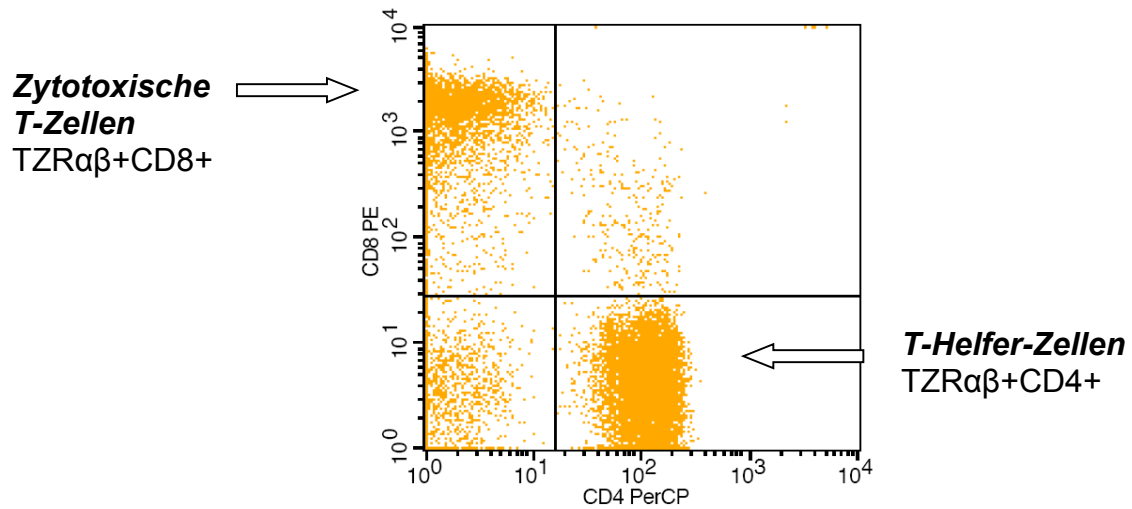


Abbildung II-5.9: T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen mit αβ-TZR

T-Zellen: Gate CD45+TZRαβ+

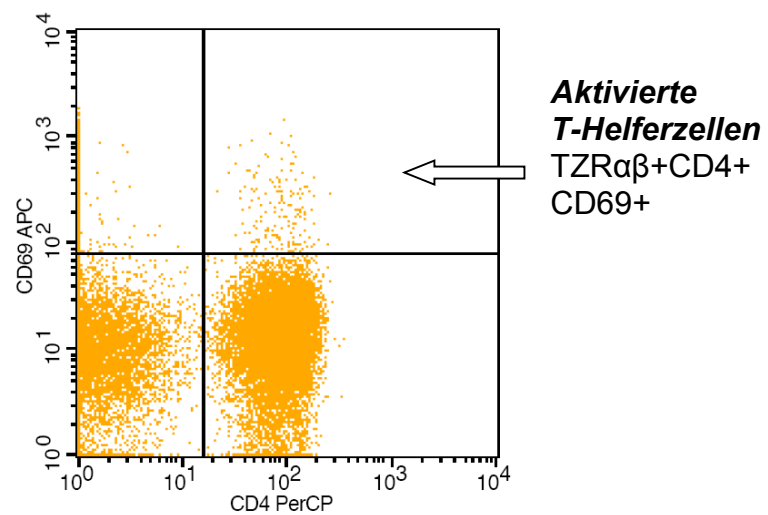


Abbildung II-5.10: Aktivierte T-Helfer-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+TZRαβ+

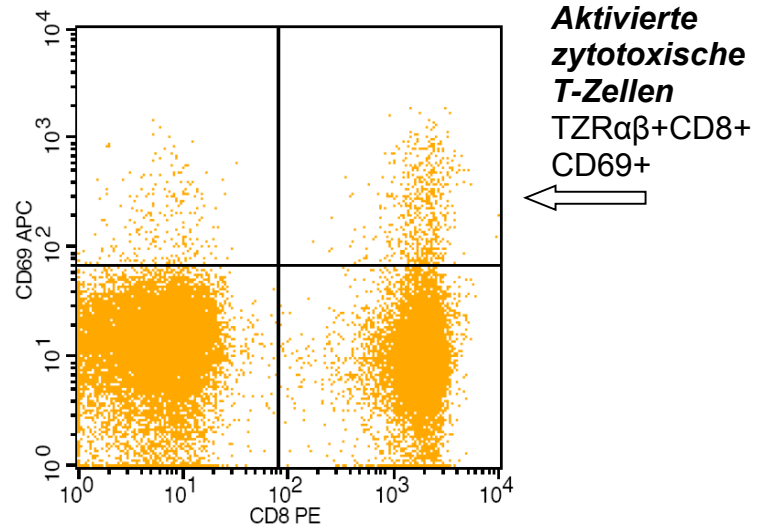


Abbildung II-5.11: Aktivierte zytotoxische T-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD4+

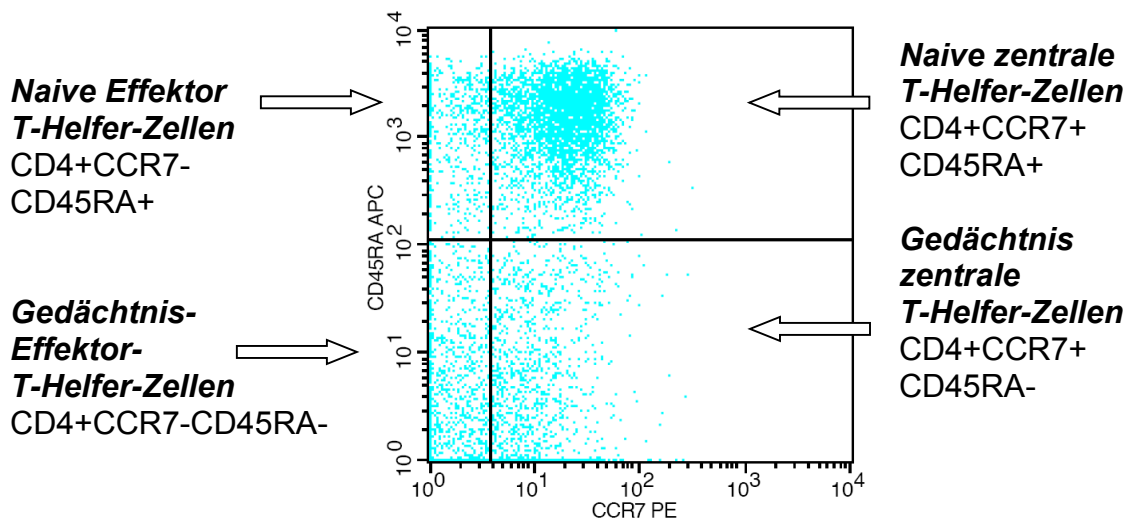


Abbildung II-5.12: Naive und Gedächtnis zentrale Effektor und T-Helfer-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD8+

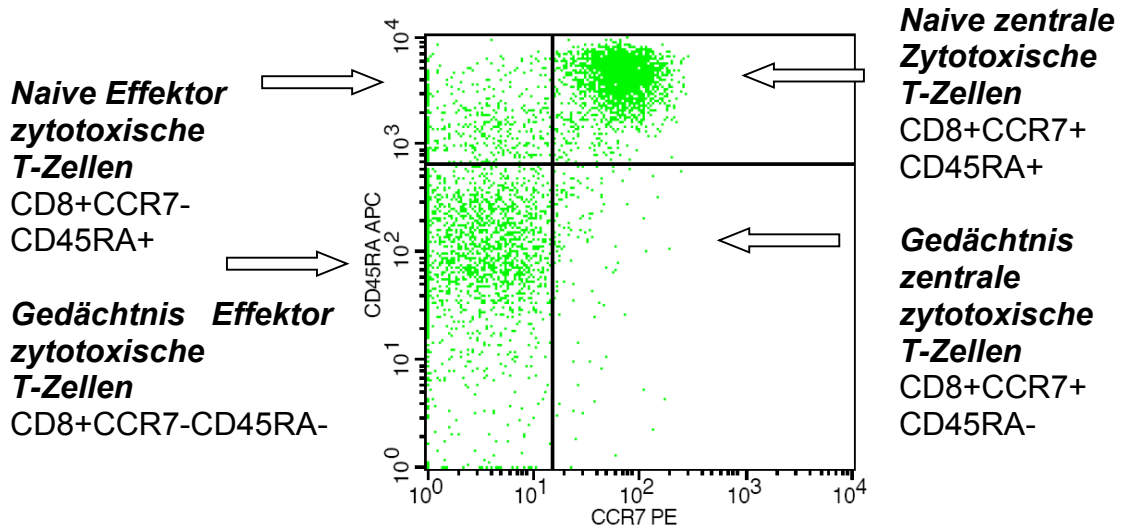


Abbildung II-5.13: Naive und Gedächtnis zentrale und Effektor zytotoxische T-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD4+

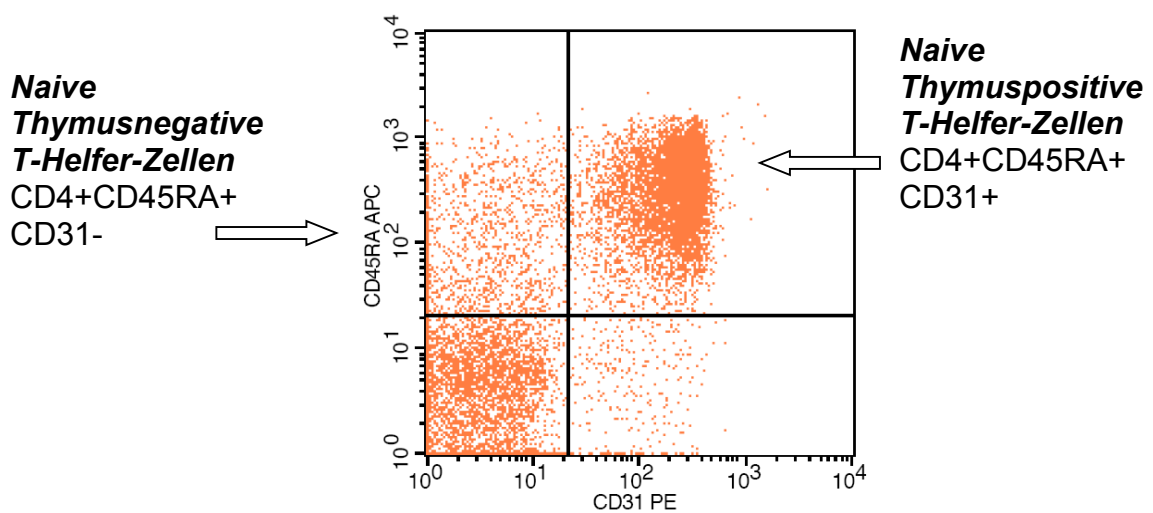


Abbildung II-5.14: Naive Thymusnegative und Thymuspositive T-Helfer-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+

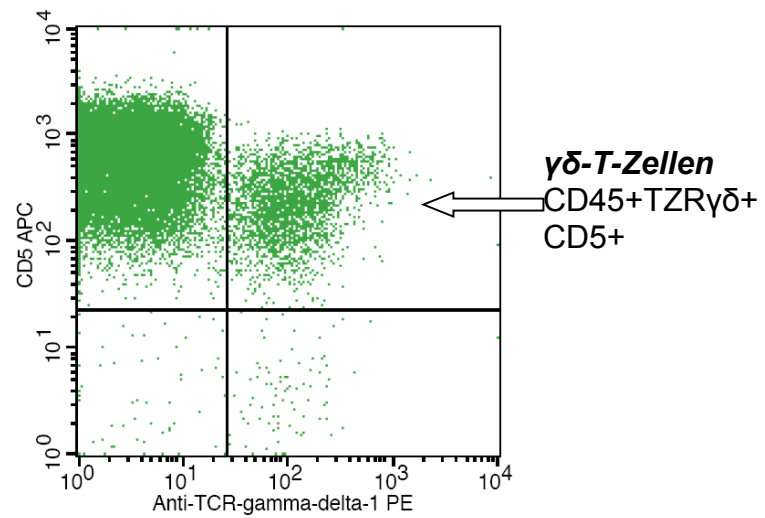


Abbildung II-5.15: T-Zellen mit γδ-TZR

T-Zellen: Gate CD45+CD3+CD4+

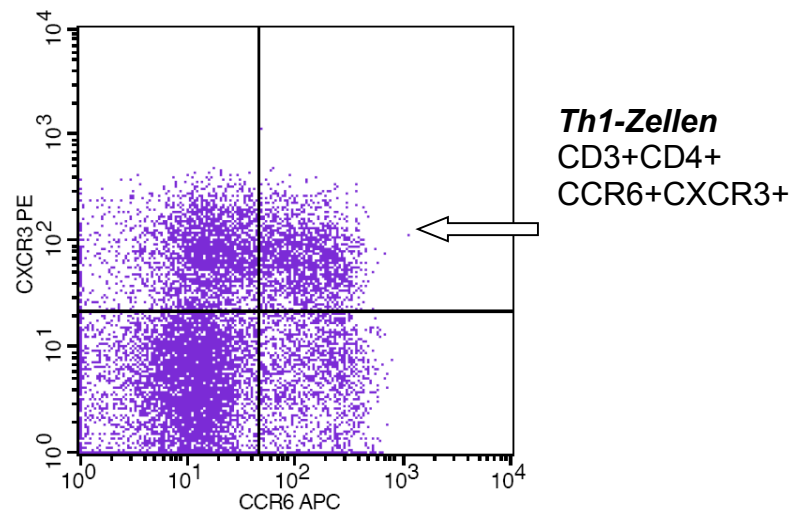


Abbildung II-5.16: Th1-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD3+CD4+

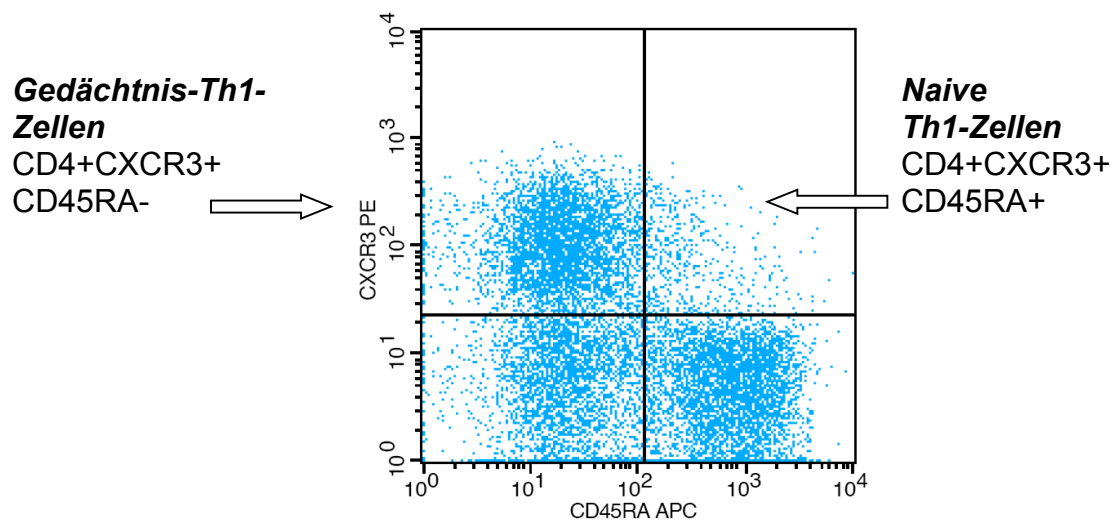


Abbildung II-5.17: Naive und Gedächtnis-Th1-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD3+CD4+

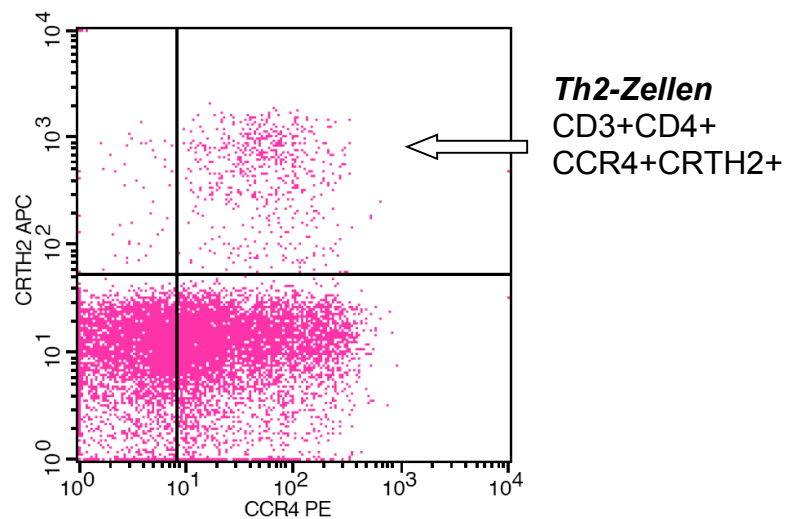


Abbildung II-5.18: Th2-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD3+CD4+

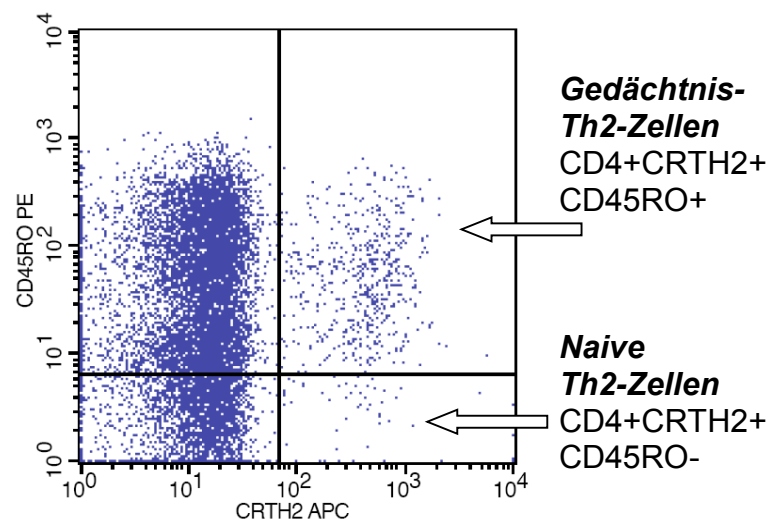


Abbildung II-5.19: Naive und Gedächtnis-Th2-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD3+CD4+

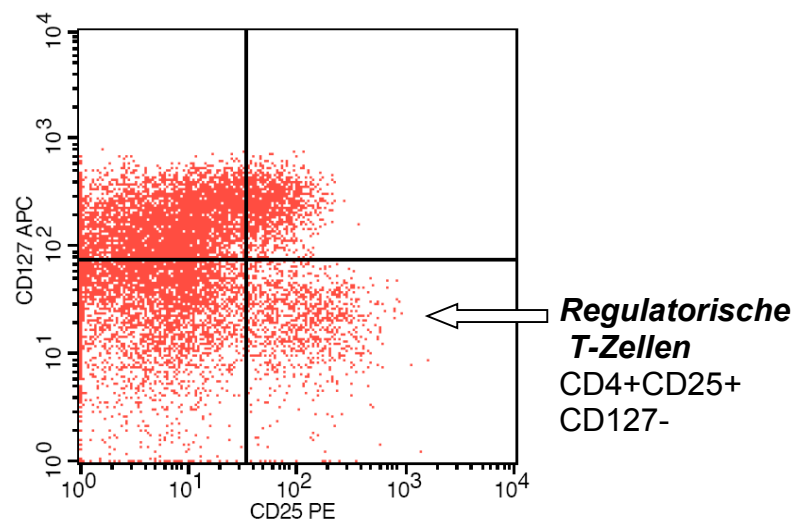


Abbildung II-5.20: Regulatorische T-Zellen

T-Zellen: Gate CD45+CD3+CD4+

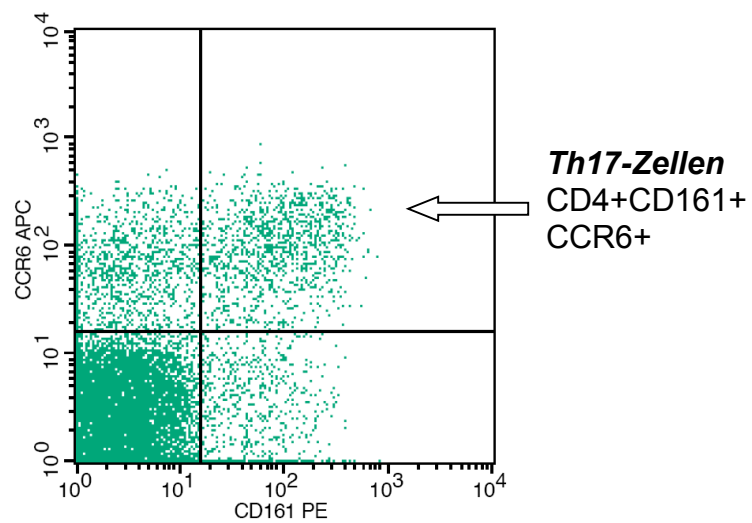


Abbildung II-5.21: Th17-Zellen

Auswertung der dendritischen Zellen

Gate R1: Ausschluss toter Zellen

Messansatz: Ohne Gate

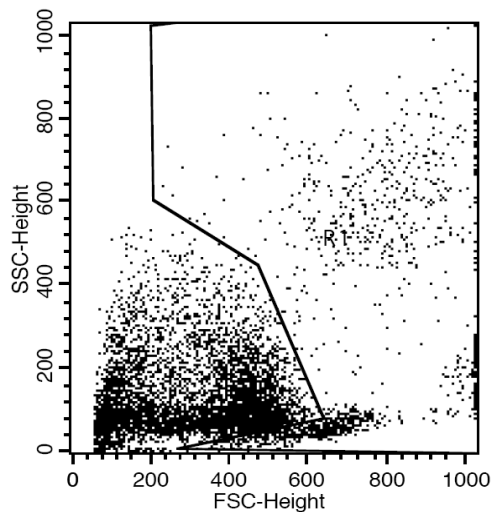


Abbildung III-5.22a:
Messansatz dendritische Zellen R1

Messansatz: Ohne Gate

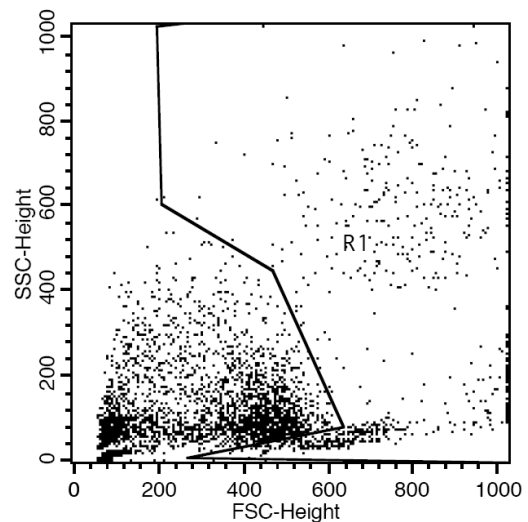


Abbildung III-5.22b:
Kontrollansatz dendritische Zellen R1

Gate R2: Ausschluss anderer Zellpopulationen

Messansatz: Gate R1

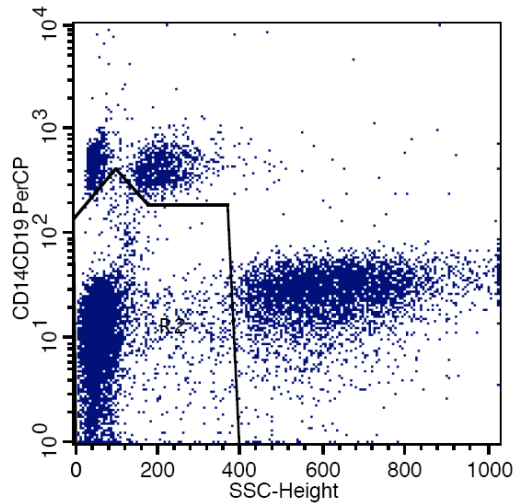


Abbildung II-5.23a:
Messansatz dendritische Zellen R2

Kontrollansatz: Gate R1

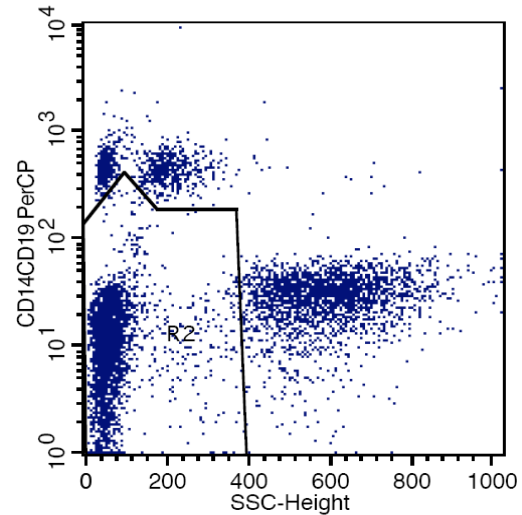


Abbildung II-5.23b:
Kontrollansatz dendritische Zellen R2

Myeloische dendritische Zellen Typ 1 (R3) und plasmatische dendritische Zellen (R4)

Messansatz: Gate R1 und R2

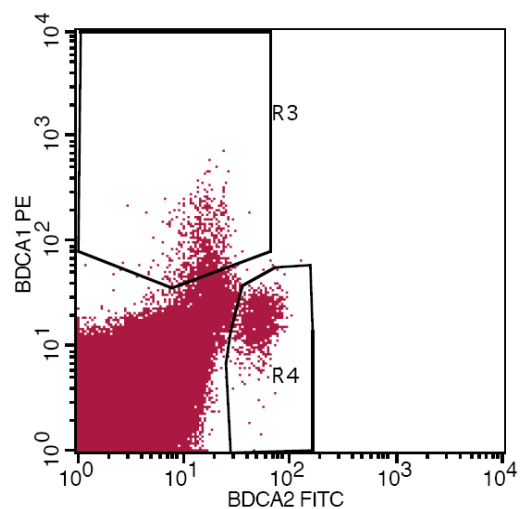


Abbildung II-5.24a:
Messansatz myeloische dendritische 1
und plasmatische dendritische Zellen

Kontrollansatz: Gate R1 und R2

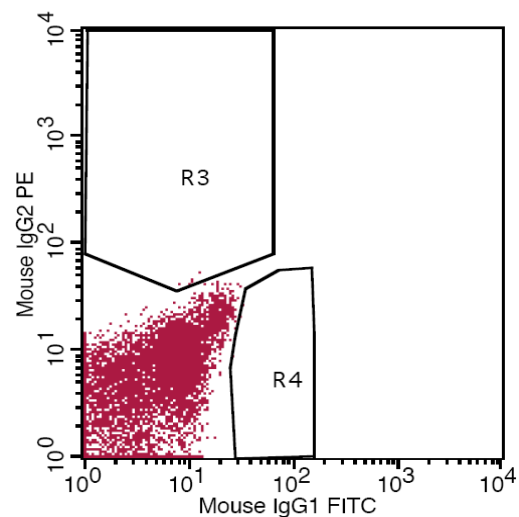


Abbildung II-5.24b:
Kontrollansatz myeloische dendritische 1
und plasmatische dendritische Zellen

Myelische dendritische Zellen Typ 2 (R5)

Messansatz: Gate R1 und R2

Kontrollansatz: Gate R1 und R2

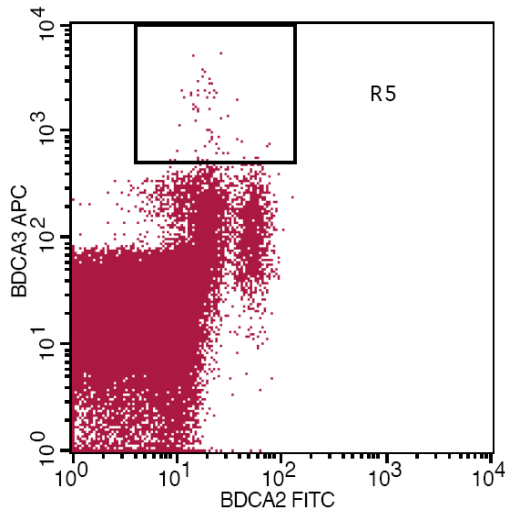


Abbildung II-5.25a:

Messansatz myelische dendritische Zellen 2

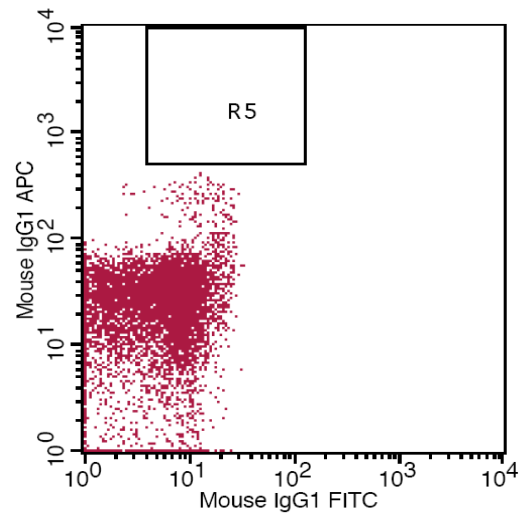


Abbildung II-5.25b:

Kontrollansatz myelische dendritische Zellen 2

Tabelle II-5.1: Definition der Zellpopulationen

Zellpopulationen	Definition	
B-Zellen (BZ)	CD19+	% CD19+ B-Zellen
Unreife B-Zellen	CD19+CD27-IgD-IgM-	% CD19+ B-Zellen
Transitionale B-Zellen	CD19+CD27+IgM+CD38+	% CD19+ B-Zellen
Prä-Naive B-Zellen (B1)	CD19+CD5+	% CD19+ B-Zellen
Naive B-Zellen	CD19+CD27-IgD+IgM+	% CD19+ B-Zellen
Gedächtnis-B-Zellen 1	CD19+CD27+	% CD19+ B-Zellen
Gedächtnis-B-Zellen 2	CD19+CD27+IgD+	% CD19+ B-Zellen
Marginalzonen-ähnliche Gedächtnis-BZ	CD19+CD27+IgD+IgM+	% CD19+ B-Zellen
Ausschließlich IgM- Gedächtnis-BZ	CD19+CD27+IgD-IgM+	% CD19+ B-Zellen
Klassengewechselte Gedächtnis-BZ	CD19+CD27+IgD-IgM-	% CD19+ B-Zellen
Späte Gedächtnis-B-Zellen	CD19+CD27+IgM+CD38+	% CD19+ B-Zellen
Plasmablasten	CD19+CD27+IgM-CD38++	% CD19+ B-Zellen
CD21-negative B-Zellen	CD19++CD38-CD21-	% CD19+ B-Zellen
B2-Zellen	CD19+CD5-	% CD19+ B-Zellen
T-Helfer-Zellen mit αβ-TZR	TZRaβ+CD4+	% TZRaβ+ T-Zellen
Zytotoxische T-Zellen mit αβ-TZR	TZRaβ+CD8+	% TZRaβ+ T-Zellen
Aktivierte T-Helfer-Zellen mit αβ-TZR	TZRaβ+CD4+ CD69+	% TZRaβ+ T-Zellen
Aktivierte zytotoxische TZ mit αβ-TZR	TZRaβ+CD8+ CD69+	% TZRaβ+ T-Zellen

Zellpopulationen	Definition	
T-Zellen	CD3+	% Lymphozyten
T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TZR	CD3+TZR $\gamma\delta$ +CD5+	% CD3+ T-Zellen
T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+	% Lymphozyten
Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD45RA-CCR7-	% CD3+ T-Zellen
Gedächtnis zentrale T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD45RA-CCR7+	% CD3+ T-Zellen
Naive Effektor T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD45RA+CCR7-	% CD3+ T-Zellen
Naive zentrale T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD45RA+CCR7+	% CD3+ T-Zellen
Zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+	% Lymphozyten
Gedächtnis Effektor zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD45RA-CCR7-	% CD3+ T-Zellen
Gedächtnis zentrale zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD45RA-CCR7+	% CD3+ T-Zellen
Naive Effektor zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD45RA+CCR7-	% CD3+ T-Zellen
Naive zentrale zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD45RA+CCR7+	% CD3+ T-Zellen
Naive Thymusnegative T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD45RA+CD31-	% CD3+ T-Zellen
Naive Thymuspositive T-Helfer-Zellen	CD3+CD4+CD45RA+CD31+	% CD3+ T-Zellen
Th1-Zellen	CD3+CD4+CXCR3+CCR6+	% CD3+ T-Zellen
Th2-Zellen	CD3+CD4+CCR4+CRTH2+	% CD3+ T-Zellen
Gedächtnis-Th1-Zellen	CD3+CD4+CXCR3+CD45RA-	% CD3+ T-Zellen
Gedächtnis-Th2-Zellen	CD3+CD4+CRTH2+CD45RO+	% CD3+ T-Zellen
Regulatorische T-Zellen	CD3+CD4+CD25+CD127-	% CD3+ T-Zellen
Th17-Zellen	CD3+CD4+CD161+CCR6+	% CD3+ T-Zellen
Myeloische dendritische Zellen Typ 1	CD19-BDCA1+	% Leukozyten
Myeloische dendritische Zellen Typ 2	CD19-BDCA3+	% Leukozyten
Plasmatische dendritische Zellen	CD19-BDCA2+	% Leukozyten

II-6.1 Angewandte statistische Verfahren

Für die statistischen Analysen wurde das Statistikprogramm SPSS17 von SPSS Inc. verwendet. Es wurden eine Prätest-Wahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ und eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

Mit der multivariaten Varianzanalyse wurde die Abhängigkeit der Werte von Geschlecht und Alter geprüft.

Beim Vergleich der Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

III Ergebnisse

III-1 Patientenkollektiv und statistische Auswertung

In den Tabellen III-1.1 und III-1.2 sind Anzahl, Alter, Geschlecht und allergische Erkrankungen im Patientenkollektiv dargestellt.

Tabelle III-1.1: Charakterisierung des Patientenkollektivs

	Ohne Allergien	Mit Allergien
Anzahl	25	31
Durchschnittsalter Median und Streuung (Jahre)	4 +/- 2,4 Jahre	9 +/- 5,4 Jahre
Geschlechtsverhältnis männlich/weiblich	11/14	23/8

Tabelle III-1.2: Verteilung der allergischen Erkrankungen in der Studienpopulation

Allergische Erkrankung				
Allergisches Asthma bronchiale	insgesamt 77,4% (n=24)	kontrolliert 58,1% (n=18)	teilweise kontrolliert 18,1% (n=5)	nicht kontrolliert 3,2% (n=1)
Allergische Rhinokonjunktivitis	29% (n=9)			
Atopische Dermatitis	29% (n=9)			
Nahrungsmittelallergie	13% (n=4)			

In der Studienpopulation wiesen 77,4% (n=24) der Kinder-und Jugendlichen ein allergisches Asthma bronchiale auf. Innerhalb dieser Gruppe zeigten 58,1% (n=18) der untersuchten Patienten ein kontrolliertes Asthma bronchiale, 18,2% (n=5) ein teilweise kontrolliertes Asthma bronchiale sowie 3,2% (n=1) ein unkontrolliertes Asthma bronchiale. 29,9% (n=9) der Studienpopulation litt unter

Ergebnisse

Allergischer Rhinokonjunktivitis, ebenso 29,9% (n=9) an einer atopischen Dermatitis. Zudem wiesen 13% (n=4) der Gruppe eine Nahrungsmittelallergie auf.

Von den diagnostizierten Erkrankungen waren 83,9% Einzeldiagnosen; 6,5% der Kinder und Jugendlichen litten unter zwei allergischen Krankheitsbildern gleichzeitig. Ein atopisches Syndrom mit allergischem Asthma bronchiale, allergischer Rhinokonjunktivitis und atopischer Dermatitis bestand in 6,5% der Fälle. Bei 3,2% der Kinder und Jugendlichen wurden alle 4 allergischen Krankheitsbilder (allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis und Nahrungsmittelallergie) diagnostiziert.

51,6% der Kinder mit allergischen Erkrankungen erhielten mindestens eine Form der Dauermedikation mit Bronchodilatoren, inhalativen Kortikosteroiden und/oder Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten zum Zeitpunkt der Untersuchung (siehe Tabelle III-1.3).

Tabelle III-1.3: Medikamentöse Behandlung der Kinder und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen zum Zeitpunkt der Untersuchung

Dauermedikation bei Kindern mit allergischen Erkrankungen zum Zeitpunkt der Untersuchung	
48,4%	Keine Medikation
19,4%	Leukotrien-Rezeptor-Antagonist
16,1%	Bronchodilatator, inhalatives Corticosteroid und Leukotrien-Rezeptor-Antagonist
9,7%	Inhalatives Corticosteroid
3,2%	Inhalatives Corticosteroid und Leukotrien-Rezeptor-Antagonist
3,2%	Bronchodilatator und Leukotrien-Rezeptor-Antagonist

III-3 Messergebnisse der Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern ohne allergische Erkrankungen

Tabelle III-2.1: Zellpopulationen bei Kindern und Jugendlichen ohne allergische Erkrankungen

Zellpopulation	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
Leukozyten (G/l)	4,33	19,80	7,40	3,29
Lymphozyten (% Leukozyten)	27,00	65,00	45,00	10,35
Monozyten (% Leukozyten)	3,00	16,00	8,12	2,85
Neutrophile Granulozyten (% Leukozyten)	25,00	63,00	43,52	10,54
Eosinophile Granulozyten (% Leukozyten)	1,00	7,00	2,83	1,49
Basophile Granulozyten (% Leukozyten)	0,00	1,00	0,42	0,51
B-Zellen (G/l)	0,29	4,45	1,35	1,18
B-Zellen (% Lymphozyten)	4,42	46,49	16,68	9,25
Unreife B-Zellen (% B-Zellen)	0,00	4,58	1,56	1,18
Naive B-Zellen (% B-Zellen)	63,54	94,30	81,25	7,96
Marginalzonen-ähnliche B-Zellen (% B-Zellen)	2,28	17,22	7,15	3,61
Nur IgM-gewechselte B-Zellen (% B-Zellen)	0,23	3,66	1,40	0,92
Transitionale B-Zellen (% B-Zellen)	4,78	28,69	9,75	5,62
Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (% B-Zellen)	1,84	17,64	6,19	4,02
Späte Gedächtnis-B-Zellen (% B-Zellen)	0,36	6,24	2,61	1,64
Plasmablasten (% B-Zellen)	0,06	2,80	0,75	0,60
CD21-negative B-Zellen (% B-Zellen)	2,07	27,53	13,62	7,57
B1-Zellen (% B-Zellen)	0,88	98,00	28,76	29,84
T-Zellen (G/l)	1,99	13,63	4,81	2,33
T-Zellen (% Lymphozyten)	32,94	82,91	65,20	11,44
T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TZR (% T-Zellen)	2,78	40,85	9,77	7,33
T-Helfer-Zellen (% Lymphozyten)	11,78	56,82	37,26	10,47
Gedächtnis-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	3,02	25,27	13,33	5,33
Zytotoxische T-Zellen (% Lymphozyten)	9,22	43,93	22,87	6,94

Ergebnisse

Zellpopulation	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
T-Helfer-Zellen mit $\alpha\beta$ -TZR (% T-Zellen)	39,26	74,48	58,18	9,51
Aktivierte T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	0,19	2,28	0,73	0,50
Zytotoxische T-Zellen mit $\alpha\beta$ -TZR (% T-Zellen)	20,78	54,02	34,70	8,33
aktivierte zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	0,16	2,74	1,16	0,68
Naive zentrale T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	0,33	83,33	31,96	16,55
Gedächtnis zentrale T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	2,47	24,33	11,07	4,83
Naive Effektor T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	1,33	10,84	4,91	2,73
Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	0,03	11,71	5,80	3,21
Naive zentrale zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	4,52	28,11	16,07	5,34
Gedächtnis zentrale zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	0,29	10,48	3,67	3,05
Naive Effektor zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	1,62	17,14	6,15	3,62
Gedächtnis-Effektor zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	0,91	25,15	6,54	5,78
Thymusnegative T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	2,73	14,94	7,06	3,16
Thymuspositive T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	16,77	51,82	33,52	10,61
Th1-Zellen (% T-Zellen)	0,00	6,41	1,93	1,45
Gedächtnis-Th1-Zellen (% T-Zellen)	2,00	11,46	6,28	2,51
Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,18	2,81	0,74	0,67
Gedächtnis-Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,05	2,45	0,64	0,68
Regulatorische T-Zellen (% T-Zellen)	0,46	21,19	3,78	3,83
Th17-Zellen (% T-Zellen)	0,16	16,24	2,73	3,14
Myeloische dendritische Zellen Typ1 (% Leukozyten)	0,00	1,55	0,39	0,36
Myeloische dendritische Zellen Typ2 (% Leukozyten)	0,00	0,32	0,06	0,07
Plasmatische dendritische Zellen (% Leukozyten)	0,00	4,83	0,72	0,98

Erstmals konnten somit quantitative Referenzwerte für differenzierte Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen ohne allergische Erkrankung erstellt werden.

III-4 Quantitativer Vergleich der Immunzell-Subpopulationen von Kindern mit und ohne allergischen Erkrankungen

Tabelle III-4.1: Vergleich der Zellpopulationen von Kindern und Jugendlichen ohne und mit Allergien. Die Werte sind als Mittelwert +/- SD angegeben.

Zellpopulation	Kontroll-patienten	Allergiker	Δ	P
Lymphozyten (% Leukozyten)	45,0 +/- 10,4	36,1 +/- 7,9	8,9	0,002
Monozyten (% Leukozyten)	8,1 +/- 2,9	7,3 +/- 2,1	0,8	0,509
Neutrophile Granulozyten (% Leukozyten)	43,5 +/- 10,5	48,6 +/- 10,5	5,1	0,127
Eosinophile Granulozyten (% Leukozyten)	2,8 +/- 1,5	7,7 +/- 7,3	4,9	0,000
Basophile Granulozyten (% Leukozyten)	0,4 +/- 0,5	0,9 +/- 1,6	0,5	0,372
Natürliche Killer-T-Zellen (% Lymphozyten)	1,1 +/- 0,9	3,5 +/- 10,5	2,4	0,067
Natürliche Killerzellen gesamt (% Lymphozyten)	32,4 +/-20,7	29,9 +/- 18,3	2,5	0,837
Reife Natürliche Killerzellen (% Lymphozyten)	27,6 +/-18,4	25,6 +/- 17,1	1,9	0,876
Vorstufen Natürliche Killerzellen (% Lymphozyten)	3,9 +/- 3,2	3,3 +/- 2,4	0,6	0,463
B-Zellen (% Lymphozyten)	16,7 +/- 9,3	15,8 +/- 6,0	0,9	0,941
Unreife B-Zellen (% B-Zellen)	1,6 +/- 1,2	1,6 +/- 1,2	0,1	0,767
Transitionale B-Zellen (% B-Zellen)	9,8 +/- 5,6	8,7 +/- 4,3	1,0	0,564
Naive B-Zellen (% B-Zellen)	81,3 +/- 7,9	75,0 +/- 18,6	6,2	0,467
Marginalzonen-ähnliche B-Zellen (% B-Zellen)	7,2 +/- 3,6	6,5 +/- 3,9	0,7	0,306
Nur IgM-gewechselte B-Zellen (% B-Zellen)	1,4 +/- 0,9	1,8 +/- 1,8	0,4	0,666
Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen (% B-Zellen)	6,2 +/- 4,0	7,9 +/- 5,8	1,7	0,319
Späte Gedächtniszellen (% B-Zellen)	2,6 +/- 1,6	3,73 +/- 3,2	1,1	0,134
Plasmablasten (% B-Zellen)	0,8 +/- 0,6	2,1 +/- 3,3	1,4	0,090
CD21-negative B-Zellen (% B-Zellen)	13,6 +/- 7,6	13,9 +/- 8,7	0,2	0,941
B1-Zellen (% B-Zellen)	28,7 +/- 29,8	25,2 +/- 24,9	3,6	0,692
T-Zellen (% Lymphozyten)	65,2 +/- 11,4	69,9 +/- 10,1	4,7	0,140
T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TZR (% T-Zellen)	9,8 +/- 7,3	8,8 +/- 5,3	0,9	0,735
T-Helfer-Zellen (% Lymphozyten)	37,3 +/- 10,5	39,5 +/- 7,9	2,2	0,443
Gedächtnis-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	13,3 +/- 5,3	15,6 +/- 4,5	2,2	0,088

Ergebnisse

Zellpopulation	Kontroll- patienten	Allergiker	Δ	p
Zytotoxische T-Zellen (% Lymphozyten)	22,9 +/- 6,9	22,7 +/- 6,3	0,2	0,793
T-Helfer-Zellen mit αβ-TZR (% T-Zellen)	58,2 +/- 9,5	61,9 +/- 7,2	3,8	0,085
Aktivierte T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	0,7 +/- 0,5	0,9 +/- 0,6	0,2	0,119
Zytotoxische T-Zellen mit αβ-TZR (% T-Zellen)	34,7 +/- 8,3	32,9 +/- 6,7	1,7	0,255
Aktivierte zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	1,16 +/- 0,68	1,06 +/- 0,63	0,1	0,448
Naive zentrale T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	31,9 +/- 16,6	30,3 +/- 12,0	1,7	0,961
Gedächtnis zentrale T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	11,1 +/- 4,8	13,4 +/- 11,9	2,4	0,360
Naive Effektor T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	4,9 +/- 2,7	6,6 +/- 5,7	1,7	0,145
Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	5,8 +/- 3,2	8,6 +/- 4,3	2,8	0,008
Naive zentrale zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	16,1 +/- 5,3	16,9 +/- 5,9	0,9	0,594
Gedächtnis zentrale zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	3,7 +/- 3,1	2,3 +/- 1,7	1,4	0,118
Naive Effektor zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	6,2 +/- 3,6	7,2 +/- 4,5	1,0	0,473
Gedächtnis Effektor zytotoxische T-Zellen (% T-Zellen)	6,5 +/- 5,8	5,7 +/- 3,9	0,8	0,966
Thymusnegative T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	7,0 +/- 3,2	7,4 +/- 2,9	0,3	0,581
Thymuspositive T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	33,5 +/- 10,6	30,7 +/- 8,1	2,8	0,463
Th1-Zellen (% T-Zellen)	1,9 +/- 1,5	2,7 +/- 1,7	0,8	0,066
Gedächtnis-Th1-Zellen (% T-Zellen)	6,3 +/- 2,5	7,6 +/- 3,5	1,3	0,233
Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,7 +/- 0,7	1,1 +/- 0,6	0,3	0,066
Gedächtnis-Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,6 +/- 0,7	0,98 +/- 0,6	0,3	0,006
Regulatorische T-Zellen (% T-Zellen)	3,8 +/- 3,8	4,4 +/- 4,8	0,6	0,488
Th17-Zellen (% T-Zellen)	2,7 +/- 3,1	3,6 +/- 1,8	0,9	0,003
Myeloische dendritische Zellen Typ1 (% Leukozyten)	0,39 +/- 0,36	0,49 +/- 0,39	0,10	0,242
Myeloische dendritische Zellen Typ2 (% Leukozyten)	0,06 +/- 0,07	0,09 +/- 0,07	0,03	0,008
Plasmatische dendritische Zellen (% Leukozyten)	0,72 +/- 0,98	0,64 +/- 1,18	0,08	0,424

Ergebnisse

Kinder und Jugendliche mit allergischen Erkrankungen weisen signifikant mehr Gedächtnis-Th2-Zellen, Gedächtnis-Effektor-Th2-Zellen, Th17-Zellen und myeloische dendritische Zellen Typ 2 auf. Sie weisen ausserdem weniger Lymphozyten und mehr eosinophile Granulozyten auf als Kontrollpatienten.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im B-Zell-Kompartiment oder bei den regulatorischen T-Zellen gemessen.

Tabelle III-4.2: Vergleich der Zellpopulationen von Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Allergieformen. Die Werte sind als Mittelwert +/- Standarabweichung angegeben.

Zellpopulation	Kontroll-patienten	Allergiker gesamt	p	Patienten mit allergischem Asthma bronchiale					
	Mittelwert Standarabw.	Mittelwert Standarabw.		Kontrolliert	p	Teilweise kontrolliert	p	Asthma gesamt	p
Lymphozyten (% Leukozyten)	45,0 +/- 10,4	36,0 +/- 7,9	0,002	35,4 +/- 7,8	0,004	34,5 +/- 3,5	0,025	35,4 +/- 6,9	0,001
Eosinophile Granulozyten (% Leukozyten)	2,8 +/- 1,5	7,7 +/- 7,27	0,000	6,3 +/- 3,8	0,002	8,0 +/- 5,3	0,018	8,1 +/- 6,1	0,000
Th1-Zellen (% T-Zellen)	1,9 +/- 1,5	2,7 +/- 1,72	0,066	2,9 +/- 1,6	0,023	3,4 +/- 2,4	0,133	3,0 +/- 1,7	0,011
Gedächtnis-Th1-Zellen (% T-Zellen)	6,3 +/- 2,5	7,6 +/- 3,48	0,233	8,0 +/- 2,9	0,057	9,2 +/- 5,3	0,322	8,2 +/- 3,5	0,051
Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,7 +/- 0,7	1,1 +/- 0,6	0,066	1,1 +/- 0,5	0,007	1,5 +/- 0,9	0,058	1,2 +/- 0,6	0,002
Gedächtnis-Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,6 +/- 0,7	0,9 +/- 0,6	0,006	0,9 +/- 0,5	0,003	1,4 +/- 0,8	0,013	1,1 +/- 0,6	0,000
Naive Effektor T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	4,9 +/- 2,7	6,6 +/- 5,7	0,145	4,8 +/- 2,2	0,787	8,2 +/- 2,5	0,021	5,7 +/- 2,7	0,215
Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	5,8 +/- 3,2	8,6 +/- 4,3	0,008	8,4 +/- 4,1	0,021	12,2 +/- 3,9	0,006	9,4 +/- 4,3	0,002
Gedächtnis zentrale T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	11,1 +/- 4,8	13,4 +/- 11,9	0,360	15,6 +/- 14,9	0,146	12,4 +/- 4,9	0,330	14,7 +/- 13,1	0,150
Gedächtnis-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	13,3 +/- 5,3	15,56 +/- 4,5	0,088	15,5 +/- 4,1	0,140	20,1 +/- 3,8	0,013	16,4 +/- 4,3	0,031
T-Helfer-Zellen mit $\alpha\beta$ -TZR (% T-Zellen)	58,2 +/- 9,5	61,94 +/- 7,2	0,085	62,7 +/- 6,9	0,061	62,6 +/- 5,8	0,278	62,8 +/- 6,4	0,046
T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TZR (% T-Zellen)	9,8 +/- 7,3	8,84 +/- 5,3	0,735	8,4 +/- 5,9	0,377	9,3 +/- 2,6	0,718	8,5 +/- 5,2	0,476
TH17-Zellen (% T-Zellen)	2,7 +/- 3,1	3,61 +/- 1,8	0,003	3,9 +/- 1,7	0,002	4,8 +/- 2,3	0,038	3,9 +/- 1,8	0,001
Myeloische dendritische Zellen Typ 2 (% Leukozyten)	0,06 +/- 0,07	0,09 +/- 0,07	0,008	0,087 +/- 0,06	0,029	0,13 +/- 0,08	0,048	0,09 +/- 0,07	0,009

Ergebnisse

Zellpopulation	Kontrollpatienten	Allergische Rhinokonjunktivitis		atopische Dermatitis		Nahrungsmittelallergie	
	Mittelwert Standarabweichung	Mittelwert Standarabweichung	p	Mittelwert Standarabweichung	P	Mittelwert Standarabweichung	P
Lymphozyten (% Leukozyten)	45,0 +/- 10,4	37,7 +/- 8,1	0,105	35,4 +/- 8,6	0,024	41,3 +/- 9,1	0,612
Eosinophile Granulozyten (% Leukozyten)	2,8 +/- 1,5	9,0 +/- 12,9	0,030	8,9 +/- 11,6	0,008	14,3 +/- 16,1	0,032
Th1-Zellen (% T-Zellen)	1,9 +/- 1,5	3,4 +/- 1,2	0,002	1,9 +/- 1,4	0,861	1,2 +/- 1,2	0,311
Gedächtnis-Th1-Zellen (% T-Zellen)	6,3 +/- 2,5	8,8 +/- 2,9	0,029	6,9 +/- 3,5	0,874	4,9 +/- 1,6	0,422
Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,7 +/- 0,7	1,0 +/- 0,6	0,064	1,0 +/- 0,5	0,035	0,9 +/- 0,8	0,728
Gedächtnis-Th2-Zellen (% T-Zellen)	0,6 +/- 0,7	1,1 +/- 0,6	0,025	1,0 +/- 0,7	0,133	0,9 +/- 0,8	0,635
Naive Effektor T- Helfer-Zellen (% T-Zellen)	4,9 +/- 2,7	7,0 +/- 2,4	0,025	6,6 +/- 3,9	0,359	12,9 +/- 13,9	0,164
Gedächtnis-Effektor- T-Helfer-Zellen (% T-Zellen)	5,8 +/- 3,2	10,8 +/- 4,9	0,006	7,7 +/- 3,8	0,114	8,0 +/- 5,0	0,312
Gedächtnis zentrale T- Helfer-Zellen (% T-Zellen)	11,1 +/- 4,8	18,3 +/- 20,9	0,339	10,4 +/- 4,8	0,470	6,3 +/- 3,7	0,037
Gedächtnis-T-Helfer- Zellen	13,3 +/- 5,3	16,9 +/- 3,1	0,049	15,3 +/- 4,3	0,283	11,1 +/- 3,7	0,527
T-Helfer-Zellen mit $\alpha\beta$ - TZR (% T-Zellen)	58,2 +/- 9,5	65,7 +/- 3,0	0,020	62,5 +/- 5,7	0,266	58,5 +/- 11,1	0,850
T-Zellen mit $\gamma\delta$ -TZR (% T-Zellen)	9,8 +/- 7,3	5,8 +/- 3,2	0,049	13,1 +/- 6,3	0,085	3,9 +/- 2,2	0,058
TH17-Zellen (% T-Zellen)	2,7 +/- 3,1	3,9 +/- 1,5	0,006	3,3 +/- 1,6	0,079	2,2 +/- 0,8	0,768
Myeloische den- dritische Zellen Typ 2 (% Leukozyten)	0,06 +/- 0,07	0,09 +/- 0,06	0,125	0,09 +/- 0,07	0,053	0,05 +/- 0,03	0,974

Wie in der Tabelle dargestellt unterscheiden sich Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale und allergische Rhinokonjunktivits in vielen Lymphozyten-Subpopulationen signifikant von den Kontrollpatienten. Dabei sind neben den bereits erwähnten Lymphozyten-Subpopulationen insbesondere beim allergischen Asthma bronchiale die Th1-Zellen und Th2-Zellen, sowie bei der allergischen Rhinokonjunktivitis die Th1- und Gedächtnis-T1-Zellen hervorzuheben. In der Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit atopischer Dermatitis und mit Nahrungsmittelallergien wurden dagegen nur zwei signifikant veränderte Zellpopulationen im Vergleich zu den Kontrollpatienten gefunden: mehr Th2-Zellen bei Patienten mit atopischer Dermatitis und weniger Gedächtnis zentrale T-Helferzellen bei Patienten mit Nahrungsmittelallergien.

III-5 Veränderte Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien

Bei der komparativen Analyse der Immunzellen bei Kindern und Jugendlichen ohne und mit allergischen Erkrankungen wiesen vier Lymphozyten-Subpopulationen signifikante quantitative Unterschiede auf. Im Folgenden werden diese Lymphozyten-Subpopulationen hinsichtlich dieser Differenz sowie hinsichtlich ihrer Quantität bei verschiedenen allergischen Erkrankungen detailliert dargestellt.

III-5.1 Gedächtnis-Th2-Zellen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien

Kinder mit allergischen Erkrankungen haben signifikant mehr Gedächtnis-Th2-Zellen (0,9 +/- 0,6 % der T-Zellen) als Kinder ohne Allergien (0,6 +/- 0,7 % der T-Zellen, $p=0,006$).

Mit Ausnahme der Kinder und Jugendlichen mit atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelallergie war die Anzahl der Gedächtnis-Th2-Zellen bei Allergikern signifikant höher als bei Kontrollpatienten.

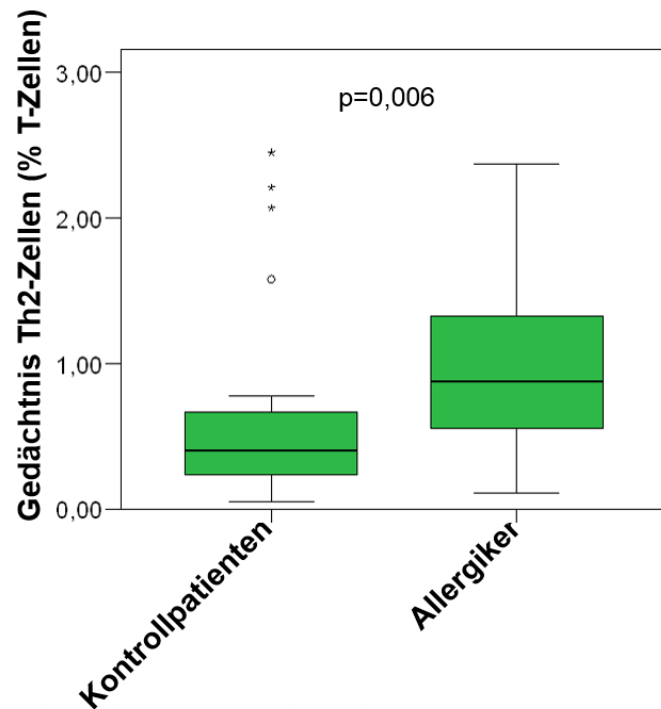


Abbildung III-5.1a: Gedächtnis-Th2-Zellen bei Kindern und Jugendlichen ohne und mit Allergien

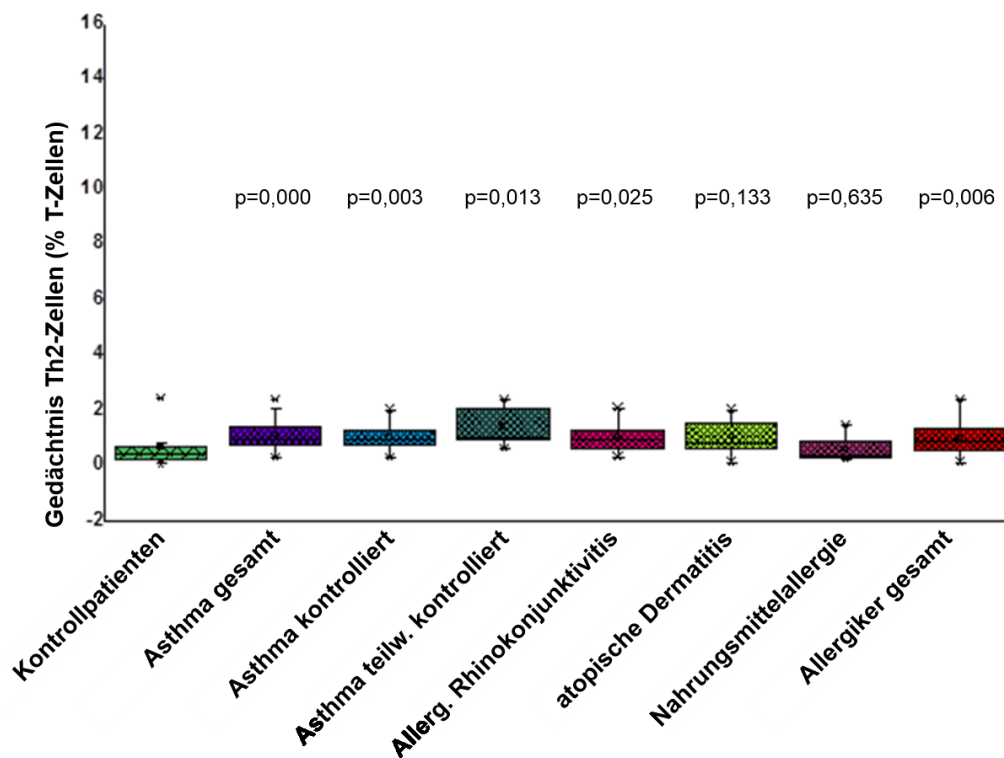


Abbildung III-5.1b: Gedächtnis-Th2-Zellen (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen allergischen Erkrankungen.

III-5.2 Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien

Pädiatrische Allergiepatienten haben signifikant mehr Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen ($8,6 \pm 4,3$ % der T-Zellen) als Kinder und Jugendliche ohne Allergien ($5,8 \pm 3,2$ % der T-Zellen, $p=0,008$).

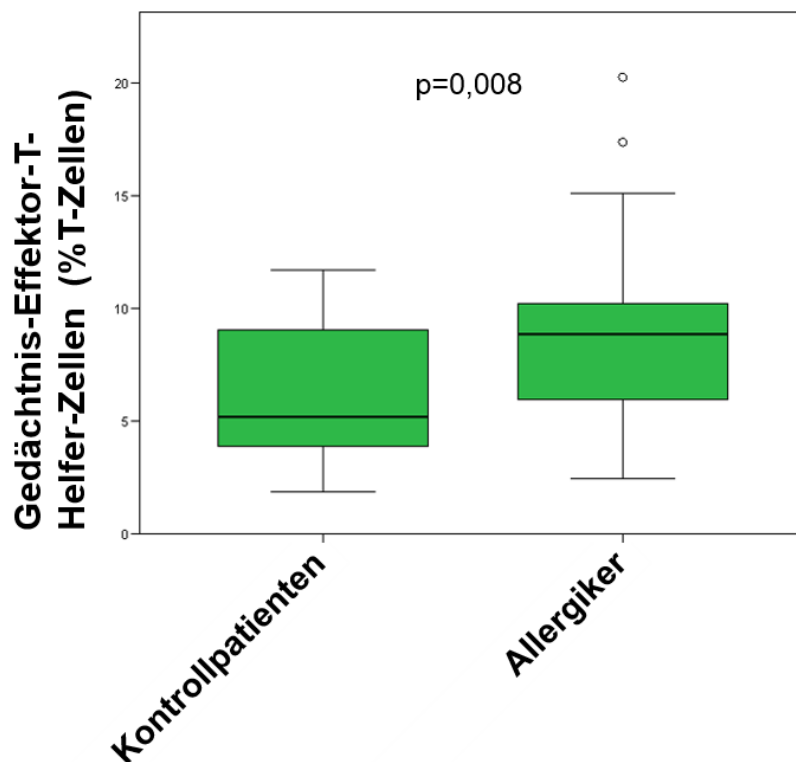


Abbildung III-5.2a: Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen ohne und mit Allergien

Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale (Asthma gesamt $9,4 \pm 4,3$ % der T-Zellen, $p=0,002$) und allergischer Rhinokonjunktivitis ($10,8 \pm 4,9$ % der T-Zellen, $p=0,006$) haben signifikant mehr Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen als Kinder und Jugendliche ohne allergische Erkrankung. Auch Kinder und Jugendliche mit Nahrungsmittelallergien und atopischer Dermatitis haben mehr Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen als Kinder und Jugendliche ohne Allergien, jedoch nicht im signifikanten Bereich.

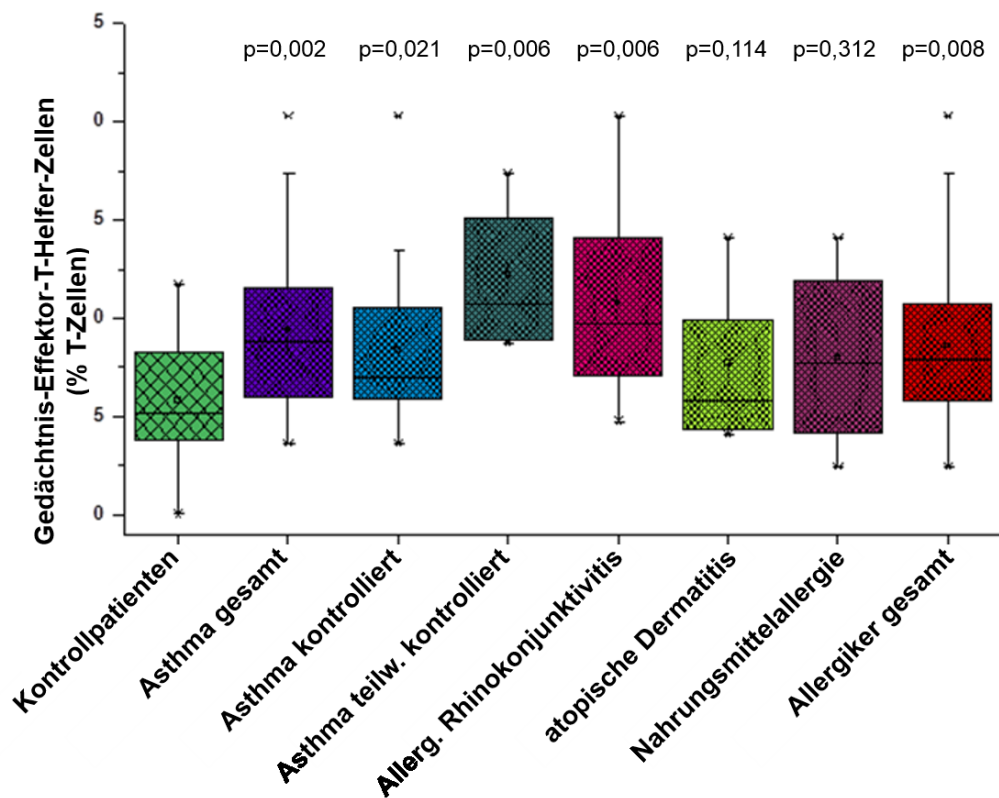


Abbildung III-5.2b: Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Allergieformen.

III-5.3 Th17-Zellen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien

Kinder und Jugendliche mit allergischen Erkrankungen wiesen signifikant mehr Th17-Zellen ($3,6 \pm 1,8$ % der T-Zellen) auf als Kinder und Jugendliche der Kontrollgruppe ($2,7 \pm 3,1$ % der T-Zellen, $p=0,003$).

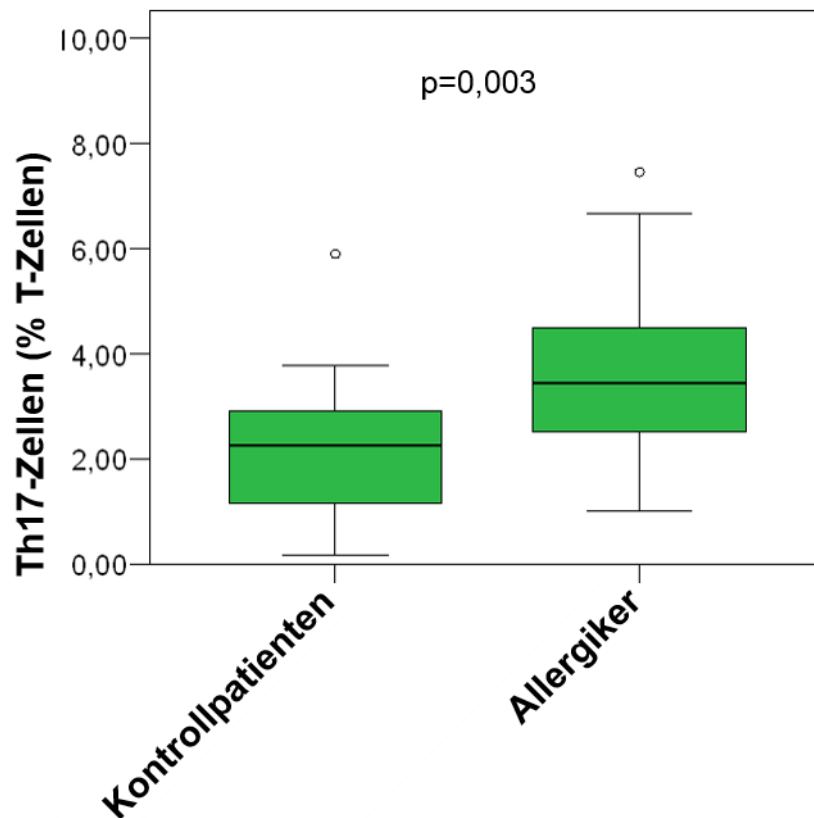


Abbildung III-5.3a: Th17-Zellen (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen ohne und mit Allergien.

Separat betrachtet wiesen Kinder und Jugendliche mit atopischer Dermatitis gegenüber Kontrollpatienten keine signifikante Differenz bei den Th17-Zellen auf ($3,3 \pm 1,6$ % der T-Zellen, $p=0,079$), während Kinder und Jugendliche mit Nahrungsmittelallergien weniger Th17-Zellen besaßen als Kinder und Jugendliche ohne Allergien ($2,2 \pm 0,8$ % der T-Zellen, $p=0,768$).

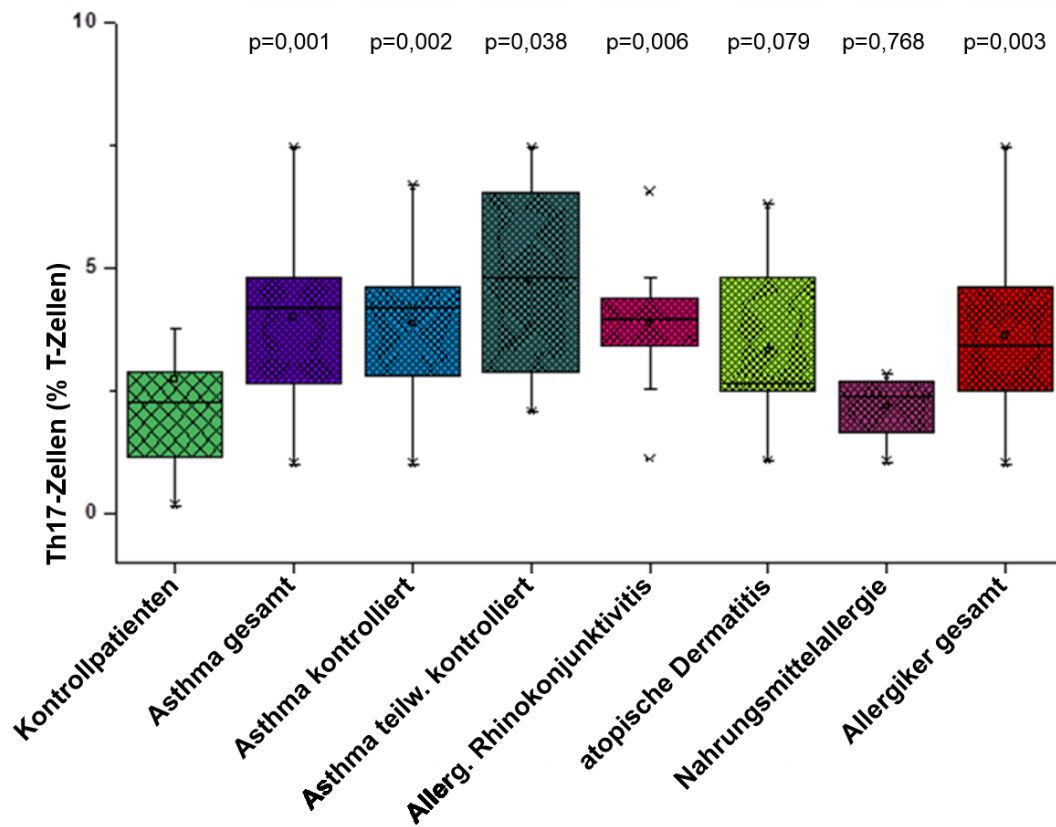


Abbildung III-5.3b: Th17-Zellen (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Allergieformen.

III-5.4 Dendritische Zellen bei Kindern und Jugendlichen mit Allergien

Kinder und Jugendliche mit allergischen Erkrankungen hatten signifikant mehr myeloische dendritische Zellen Typ 2 (MDC2: 0,1 +/- 0,07 % der Leukozyten) als Kinder und Jugendliche ohne Allergien (0,1 +/- 0,07 % der Leukozyten, $p=0,008$).

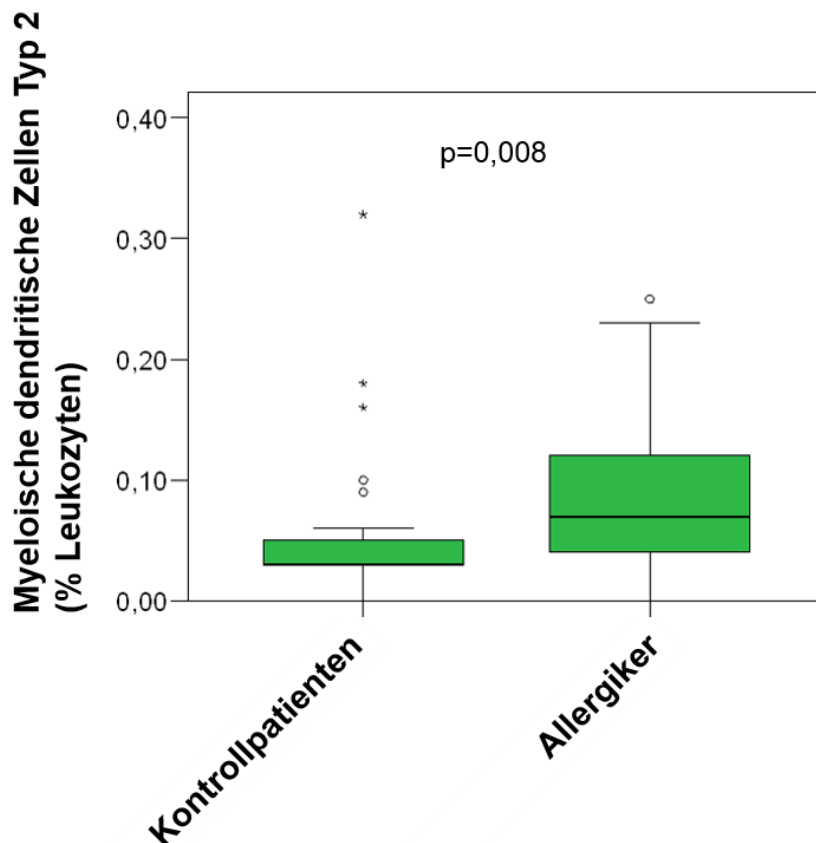


Abbildung III-5.4a: Myeloische dendritische Zellen Typ 2 (% Leukozyten) bei Kindern und Jugendlichen ohne und mit Allergien.

Die differenzierte Analyse nach unterschiedlichen allergischen Krankheitsbildern hat jedoch ergeben, dass nur Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale (Asthma gesamt 0,09 +/- 0,07 % der Leukozyten, $p=0,009$) signifikant mehr myeloische dendritische Zellen Typ 2 aufweisen als die Kontrollpatienten. Bei Kindern und Jugendlichen mit allergischer Rhinokonjunktivitis, atopischer Dermatitis sowie mit Nahrungsmittelallergien konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden.

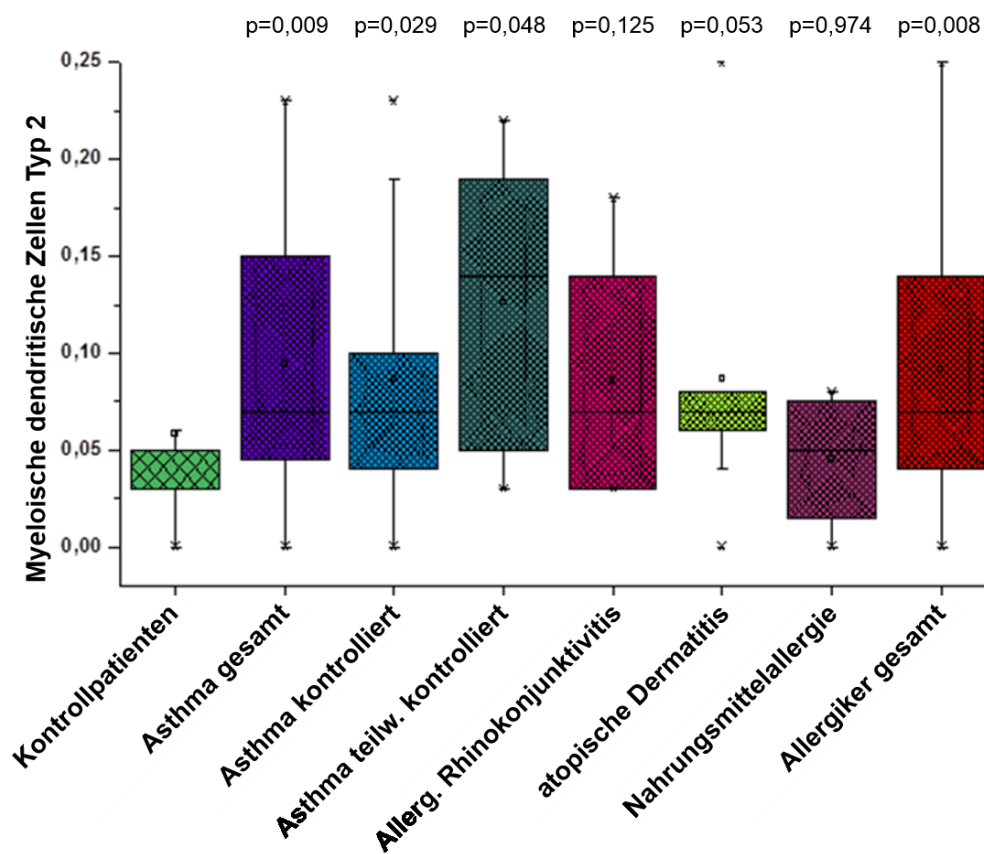


Abbildung III-5.4b: Myeloische dendritische Zellen Typ 2 (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Allergieformen.

III-6 Analyse von Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit allergischem Asthma bronchiale

Bei der Gruppe aller Kinder und Jugendlichen mit allergischem Asthma bronchiale wurde eine signifikante Erhöhung der Gedächtnis-Th2-Zellen, Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen, der Th17-Zellen und der myeloischen dendritischen Zellen Typ 2 gemessen. Ihre jeweilige Zahl war im Stadium des teilweise kontrollierten Asthma bronchiale signifikant höher als im Stadium des kontrollierten Asthma bronchiale (s. Tabelle III-4.2)

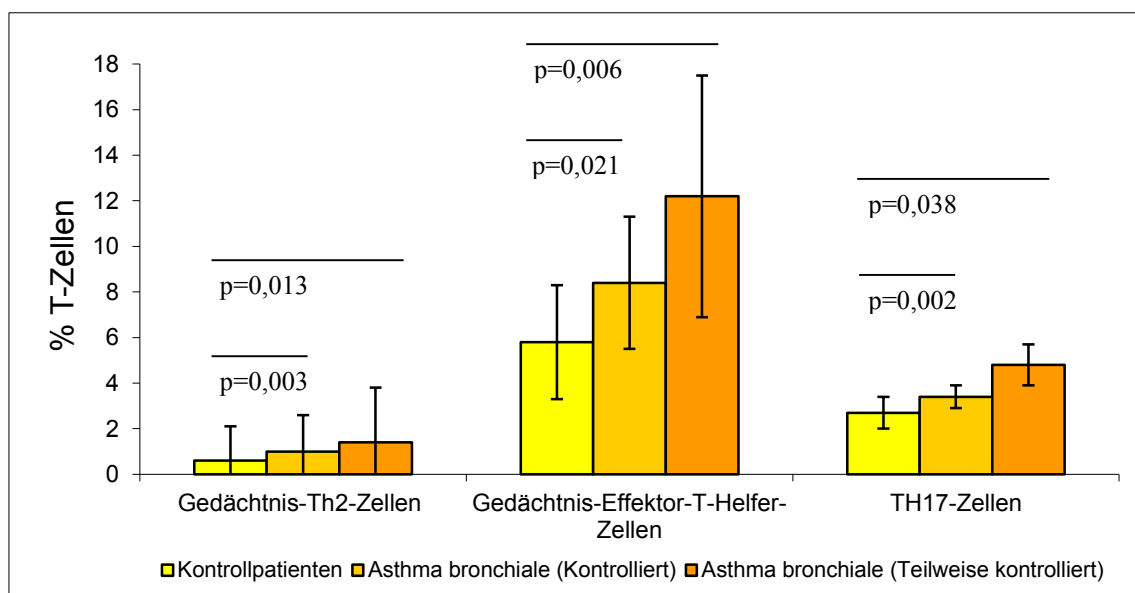


Abbildung III-6a: Gedächtnis-Th2-Zellen, Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen und Th17-Zellen (% T-Zellen) bei Kindern und Jugendlichen ohne Allergien sowie im Stadium des kontrollierten und teilweise kontrollierten allergischen Asthma bronchiale

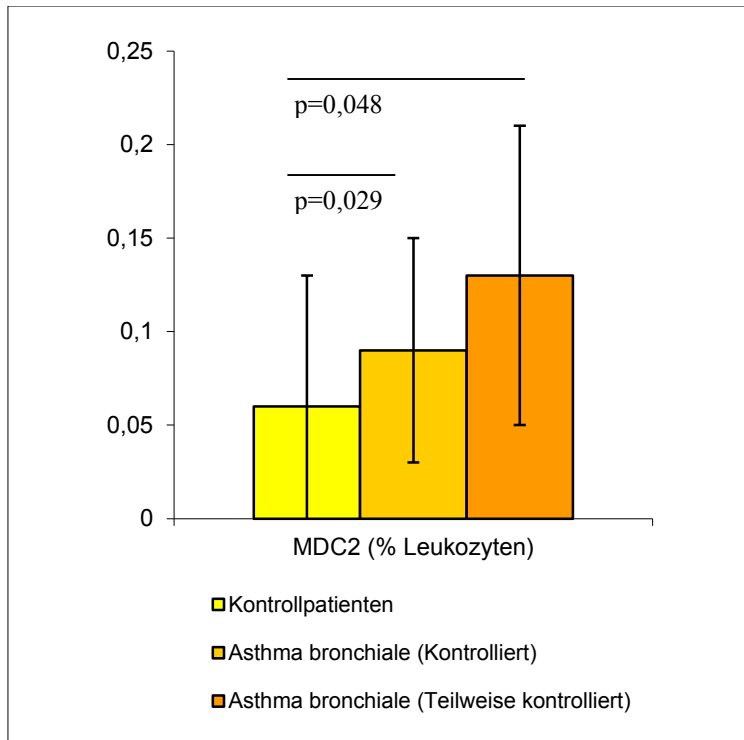


Abbildung III-6b: Myeloische dendritische Zellen Typ 2 (% Leukozyten) bei Kindern und Jugendlichen ohne Allergien sowie im Stadium des kontrollierten und teilweise kontrollierten allergischen Asthma bronchiale.

IV Diskussion

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse werden in Bezug auf Validität und pathophysiologische Relevanz zunächst insgesamt und im Rahmen der spezifischen allergischen Erkrankungen bewertet, anschließend werden die besonders herausragenden Lymphozyten-Subpopulationen detailliert betrachtet.

IV-1 Validität der experimentellen Studie

Die quantitative Analyse von Immunzellpopulationen hängt entscheidend von der experimentellen Methode und der immunphänotypischen Definition der Immunzellen ab. Ein Vergleich mit Messwerten aus der Literatur ist daher unerlässlich zur Bewertung der gewonnenen Daten.

Tabelle IV-1.1: Vergleich der Messwerte mit Literaturdaten

Immunzellen	Messwert	Wert in der Literatur
B-Zellen	1,35 G/l	0,5-2 G/l [110]
T-Zellen	4,8 G/l	2-6 G/l [110]
Regulatorische T-Zellen	3,8% der T-Zellen = 6,5% der CD4+T-Zellen	5-10% der CD4+T-Zellen [111] 7% der CD4+T-Zellen [91]
Th17-Zellen	2,7% der T-Zellen = 4,6% der CD4+T-Zellen = 1,7% der Leukozyten	1,2% der Leukozyten [81] 0,4% der Leukozyten [63] (beide bei Erwachsenen)
MDC1	0,4% der Leukozyten	0,27% der Leukozyten (Mitenyi, Erwachsene)

Immunzellen	Messwert	Wert in der Literatur
MDC2	0,06% der Leukozyten	0,02% der Leukozyten (Miltényi, Erwachsene)
MDC gesamt	0,46% der Leukozyten	0,2% (Miltényi, Kinder im Alter von 1 Jahr, n=4) 0,25% der Leukozyten [136] (bei Erwachsenen)
PDC	0,7% der Leukozyten	0,2% der Leukozyten (Miltényi, 1 Jahr, n=4) 0,19% der Leukozyten (Miltényi, Erwachsene) 0,4% der Leukozyten [136] (bei Erwachsenen)

Beachte: Einige Daten stammen von Erwachsenen und sind in dieser Tabelle besonders gekennzeichnet.

Für viele der hier gemessenen Subpopulationen ist kein unmittelbarer Vergleich mit der Literatur möglich, da bisher keine altersspezifischen (1-17 Jahre) Referenzwerte publiziert wurden. Dennoch zeigt die Analyse der Tabelle IV-1.1, dass die erhobenen Messwerte im Rahmen anderer publizierter quantitativer Analysen liegen.

Somit kann von einer technisch korrekten Quantifizierung der Immunzellpopulationen in der vorliegenden Arbeit ausgegangen werden, sofern dies anhand von Referenzwerten in der Literatur beurteilt werden kann.

IV-2 Lymphozyten-Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen

Ein Vergleich der Lymphozyten-Subpopulationen zwischen Kindern und Jugendlichen ohne und mit allergischen Erkrankungen hat signifikante Unterschiede ergeben.

Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis wiesen mehr Gedächtnis-Th2-Zellen, mehr Gedächtnis-

Diskussion

Effektor-T-Helfer-Zellen und mehr Th17-Zellen auf als Kind und Jugendliche ohne allergische Erkrankung. Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale wiesen zudem mehr myeloische dendritische Zellen Typ 2 auf als Kinder und Jugendliche ohne Allergien.

Dagegen wurden keine signifikanten Unterschiede im B-Zell-Kompartiment oder bei anderen T-Zell-Subpopulationen zwischen Kindern und Jugendlichen mit und ohne allergische Erkrankungen gemessen.

IV-2.1 T-Zellpopulationen bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Allergieformen

Allergisches Asthma bronchiale

Die hier gemessenen Werte im T-Zell-Kompartiment der naiven und der Gedächtnis-T-Helfer-Zellen bzw. – zytotoxischen T-Zellen sind vergleichbar mit Ergebnissen von Machura et al. [82]. Eine Ausnahme bildete lediglich die in jener Studie beschriebene größere Zahl der Gedächtnis zytotoxischen T-Zellen, sowie die geringere Zahl CD25-positiver T-Zellen und Gedächtnis-T-Helfer-Zellen bei Kindern mit allergischem Asthma bronchiale, die hier nicht festgestellt werden konnte. Ebenso wie in jener Studie, konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der CD4+CD25+-Population (Treg) gemessen werden, was möglicherweise auf die therapeutische Verwendung von inhalativen Corticosteroiden zurückzuführen ist [36]. Im Gegensatz dazu war von Lee et al. [74] und Mészáros et al. [91] eine signifikante Verminderung der Zahl von Treg bei pädiatrischen Patienten mit allergischem Asthma bronchiale beschrieben worden.

Die quantitative Erhöhung der Gedächtnis-Th2-Zellen, Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen, Th17-Zellen und myeloischen dendritischen Zellen Typ 2 ist zudem positiv mit der Ausprägung der klinischen Symptome im Stadium des kontrollierten und teilweise kontrollierten Asthma bronchiale assoziiert.

Insgesamt stellt die Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit allergischem Asthma bronchiale die größte Patientengruppe in dieser Studie, weswegen die Meßdaten dieser Gruppe einen höheren statistischen Einfluß gehabt haben werden als die anderen Patientengruppen.

Allergischer Rhinokonjunktivitis

Kinder und Jugendliche mit allergischer Rhinokonjunktivitis wiesen deutliche und multiple Veränderungen im T-Zell-Kompartiment auf. Sie hatten signifikant weniger $\gamma\delta$ -T-Zellen, aber signifikant mehr T-Helfer-Zellen und Gedächtnis-T-Helfer-Zellen (sowohl Th1- als auch Th2-Zellen) und naive Effektor T-Helfer-Zellen, als auch Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen und Th17-Zellen als die Kontrollgruppe. Die Veränderungen im CD4-Kompartiment zeigen eine starke Aktivierung des Immunsystems bei dieser Form der allergischen Erkrankung auf. Eine signifikante Verminderung der Anzahl der Treg bei Kindern und Jugendlichen mit AR [91] konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Atopische Dermatitis

Kinder und Jugendliche mit atopischer Dermatitis wiesen eine signifikante Erhöhung der Th2-Zellen auf, wie bereits zuvor gezeigt wurde [96]. Eine signifikant höhere Zahl von aktivierten T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen [155], Th1-Zellen [96], Th17-Zellen[63], MDC [101] [62] oder pDC [150] wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden.

Nahrungsmittelallergie

Die Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit Nahrungsmittelallergien wich von allen anderen Patienten mit allergischen Erkrankungen am meisten ab. In dieser Patientengruppe konnte keine signifikante Erhöhungen von Lymphozyten-Subpopulationen gemessen werden, lediglich eine signifikant verminderte Zahl von Gedächtnis zentralen T-Helferzellen wurde nachgewiesen. Eine signifikant verminderte Zahl von Treg [133] oder eine erhöhte Zahl dendritischer Zellen [34] konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Dabei muss auch die geringe Zahl der hier untersuchten Patienten mit Nahrungsmittelallergie die Untersuchungsergebnisse entscheidend beeinflusst haben.

IV-2.2 Gedächtnis-Th2-Zellen

Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis wiesen signifikant mehr Gedächtnis-Th2-Zellen auf (siehe Abbildung III-5.1b). Auch wurden mehr Gedächtnis-Th2-Zellen im Stadium des teilweise kontrollierten allergischen Asthma bronchiale gemessen als im Stadium des kontrollierten Asthma bronchiale. Gedächtnis-Th2-Zellen scheinen also mit der Stärke der Erkrankung beim allergischen Asthma bronchiale assoziiert zu sein (siehe Abbildung III-6a). Kinder und Jugendliche ohne Allergien wiesen in dieser Arbeit mit 0,6% Gedächtnis-Th2-Zellen der T-Zellen Messwerte im publizierten Referenzbereich (<2% der T-Zellen [31]) auf. Auch in der Literatur wurde bereits eine vermehrte Zahl der Gedächtnis-Th2-Zellen bei allergischen Erkrankungen beschrieben [145]. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist eine weitere Bestätigung der Th2-dominierten pathologischen Immunreaktion bei Menschen mit allergischen Erkrankungen. Die Quantität und Spezifität der Gedächtnis-Th2-Zellen kann unter anderem die unmittelbare Ursache für die wiederkehrende immunologische Reaktion von Patienten auf bestimmte Allergene darstellen.

IV-2.3 Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen

Kinder und Jugendlichen mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma bronchiale wiesen eine erhöhte Zahl von Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen auf im Vergleich zu Kindern ohne allergische Erkrankung auf (siehe Abbildung III-5.2b). Zudem scheint die Quantität dieser Zellen mit der Schwere der Erkrankung beim allergischen Asthma bronchiale assoziiert zu sein (s. Abbildung III-6a).

Wie bereits beschrieben, sind diese Zellen bevorzugt im entzündeten Gewebe zu finden und können dort nach Antigenstimulation schnell und effektiv Zytokine freisetzen. Dadurch können sie möglicherweise die Entzündungsreaktion und Immunaktivierung verstärken, was zu einer dysregulierten Immunreaktion bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen beitragen könnte. Andere bekannte immunologische Vorgänge, die mit erhöhten Zahlen von Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen einhergehen, sind Immunreaktionen nach Impfungen [12] und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen im Rahmen eines Graft-versus-Host-Disease [157]. Aufgrund der unmittelbaren Reaktivität von Gedächtnis-

Effektor-T-Helfer-Zellen könnten diese möglicherweise in Zukunft als Ziel therapeutischer Interventionen dienen.

IV-2.4 Th17-Zellen

Verglichen mit Kindern und Jugendlichen ohne allergische Erkrankungen wiesen die Gruppen der Kinder und Jugendlichen mit allergischem Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis signifikant mehr Th17-Zellen auf. Kinder und Jugendliche mit atopischer Dermatitis hatten nicht signifikant mehr Th17-Zellen, und Kinder und Jugendliche mit Nahrungsmittelallergien hatten sogar weniger Th17-Zellen als die Kontrollgruppe (siehe Abbildung III-5.3b). Auch Th17-Zellen korrelierten positiv mit dem klinischen Stadium des allergischen Asthma bronchiale (s. Abbildung III-6a).

Es gibt bereits Hinweise darauf, dass Th17-Zellen bei der Pathogenese von allergischen Erkrankungen eine Rolle spielen, jedoch sind die Untersuchungsergebnisse divergent, so dass ihre Rolle noch nicht abschließend geklärt ist. So wurden mehr Th17-Zellen bei erwachsenen Patienten mit Asthma bronchiale gefunden [153] [159], ebenso bei Kindern mit allergischer Rhinokonjunktivitis [22]. Erhöhte Mengen von IL-17 wurden in der Bronchiallavage von Patienten mit Asthma bronchiale gefunden, wobei die Menge mit der Stärke der Erkrankung korrelierte [151] [13]. IL-17 verstärkt die Aktivierung von glatter Muskulatur, Epithelzellen und Fibroblasten in den Bronchien [57] [59] [93]. Beim allergischen Asthma bronchiale könnten Th17-Zellen bei der Entwicklung der Th2-dominierten Immunreaktion von Bedeutung sein [103]. Auch im Mausmodell konnten nach Antigenexposition Th17-Zellen induziert werden, die die chronisch-entzündliche Reaktion in der Lunge bewirken [46].

Im Gegensatz dazu zeigten andere Daten, dass von Th17-Zellen produziertes IL-17 und IL-22 allergische Reaktionen im Mausmodell hemmen [121] [120]. Die jeweils induzierte Immunreaktion hängt möglicherweise von Zytokinen ab, die von unterschiedlichen Th17-Subpopulationen produziert werden [50]. Es wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass Th17-Zellen die Rekrutierung von neutrophilen Zellen verstärken und die Th2-dominierte Immunreaktion in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale vermindern [25] [80].

Diskussion

Allgemein findet sich eine erhöhte Anzahl von Th17-Zellen in chronisch entzündetem Gewebe wie bei Kontaktdermatitis, Psoriasis und atopischer Dermatitis [137]. Weitere chronisch-entzündliche Erkrankungen, die mit erhöhten IL-17-Konzentrationen assoziiert sind, sind Multiple Sklerose [88] [15], Rheumatoide Arthritis [67], Systemischer Lupus erythematoses [152] [123], Morbus Crohn [98] [35], ZNS-Entzündung [61], und Rheumatische Erkrankungen [9] [109].

Th17-Zellen sind Gegenstand aktueller Forschung, und viele wichtige und neue Ergebnisse bleiben abzuwarten, ehe die konkrete Funktion und Relevanz dieser Immunzellen beim Menschen, speziell bei allergischen Erkrankungen, vollständig geklärt ist.

IV-2.5 Myeloische dendritische Zellen Typ 2

Die gesamte Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit allergischem Asthma bronchiale wies signifikant mehr myeloische dendritische Zellen Typ 2 (MDC2) auf als Kinder und Jugendliche ohne Allergien. Es wurden signifikant mehr MDC2 im Stadium des teilweise kontrollierten Asthma bronchiale im Vergleich zum Stadium des kontrollierten Asthma bronchiale gemessen (siehe Abbildung III-6b), so dass ein Zusammenhang zwischen der Quantität der Zellen und der Schwere des klinischen Krankheitsbildes vermutet werden kann. Ein derartiger Unterschied konnte nicht bei Kindern und Jugendlichen mit allergischer Rhinokonjunktivitis, atopischer Dermatitis oder mit Nahrungsmittelallergien gemessen werden (s. Abbildung III-5.4b). Die hier präsentierten Daten sprechen für einen Zusammenhang zwischen MDC2 und der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. Wie in der Literatur beschrieben, können dendritische Zellen Th2-dominierte Immunreaktionen induzieren und aufrechterhalten und auf diese Weise die pathologische Immunreaktion bei Allergien beeinflussen [128] [53]. Die ausschlaggebende Subpopulation der dendritischen Zellen bei Menschen mit Allergien ist bisher noch nicht identifiziert worden.

Silver et al. haben bei Kindern mit Asthma bronchiale weniger PDC im peripheren Blut als bei gesunden Kindern gemessen [125]. Auch Hagendorn et al. [39] wiesen eine geringere Zahl PDC bei Kindern mit Allergien nach. In der hier

Diskussion

vorgelegten Studie wurde kein signifikanter quantitativer Unterschied bei den PDC zwischen Kindern und Jugendlichen mit oder ohne Allergien gemessen.

Im Gegensatz dazu konnte bei erwachsenen Asthmapatienten ein höheres Verhältnis von PDC zu MDC nachgewiesen werden als bei der Kontrollgruppe [87]. Dabei war die Gesamtzahl der dendritischen Zellen bei Patienten mit Asthma bronchiale und der Kontrollgruppe unverändert, Asthmapatienten hatten jedoch fast 100% mehr PDC und nur 50% der MDC verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch bei der atopischen Dermatitis wurden mehr PDC und weniger MDC im Blut beschrieben [44].

Zusätzliche Hinweise auf die pathogenetische Rolle von DC bei Allergien ergaben sich aus Lokalisationsstudien in nasaler und bronchialer Mukosa von Patienten mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma bronchiale [54] [55]. Hier zeigten sich Hinweise auf Veränderungen des Verhältnisses von MDC zu PDC in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf nach Allergenprovokation. So wurden 4-5 Stunden nach Provokation MDC in der Bronchialschleimhaut nachgewiesen, während PDC erst nach 7 Tagen auftraten. Auch in der nasalen Mukosa wurde 7 Tage nach topischer Allergenprovokation eine Rekrutierung von PDC aus dem Blut beobachtet. Die Zahl der rekrutierten DC überstieg bei Patienten mit allergischen Erkrankungen deutlich die Zahl der DC bei gesunden Probanden, allerdings wurde auch eine erhebliche individuelle Varianz bei der Quantität der dendritischen Zellen festgestellt [54] [55].

Somit könnten die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse auf die Redistribution der dendritischen Zellen zwischen Gewebe und Blut zurückzuführen sein.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von MDC2 in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale hin [117]. Die genaue Rolle und Funktion der MDC2 im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale bleibt noch zu klären.

IV-3 Stärken und Schwächen dieser Studie

In dieser experimentellen Studie konnte erstmals eine detaillierte Differenzierung und Quantifizierung aktueller Lymphozyten-Subpopulationen im Blut von Kindern und Jugendlichen mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Durch

Diskussion

das Messpanel konnten relevante Veränderungen beim Vergleich von Kindern und Jugendlichen ohne und mit allergischen Erkrankungen detektiert werden.

Die größte Schwäche der Studie besteht in ihrer kleinen Fallzahl, insbesondere bei der Unterteilung in verschiedenen allergische Krankheitsbilder. So stehen sich 24 untersuchte Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale nur 4 Kindern und Jugendlichen mit Nahrungsmittelallergien gegenüber. Daraus resultiert eine mangelhafte statistische Analyse der Messwerte in der kleinen Gruppe der Patienten mit Nahrungsmittelallergien. Zudem wird die gesamte statistische Auswertung der Messwerte von Kindern und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen eher durch die Charakteristika von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale geprägt sein als durch andere allergische Erkrankungen. Unberücksichtigt blieb außerdem der Einfluß der Dauermedikation in Form von Corticosteroiden, Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten und Bronchodilatoren.

IV-4 Ausblick

In der immunologischen Forschung werden immer wieder neue Zellpopulationen definiert und charakterisiert, die mit bestimmten Erkrankungen einhergehen. Ihre Relevanz und Relation innerhalb des Immunsystems ist dabei häufig schwierig einzuschätzen. In dieser Arbeit wurden Immunzellpopulationen nach dem aktuellen Kenntnisstand quantifiziert, um ihre mögliche Relevanz bei Kindern und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen zu erfassen. Die quantitativ signifikant veränderte Lymphozyten-Subpopulationen können nun weiter in ihrer Funktionalität und in Abhängigkeit verschiedener allergischer Erkrankungen untersucht werden. Während die Bedeutung von Gedächtnis-Th2-Zellen und Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen im Rahmen allergischer Reaktionen bestätigt werden konnte, muss die Funktion von Th17-Zellen und myeloischen dendritischen Zellen Typ 2 noch weiter untersucht werden. Sie bieten somit einen Ansatzpunkt für weitere experimentelle und therapeutische Studien.

V Zusammenfassung

In der vorgelegten experimentellen Studie wurden Lymphozyten-Subpopulationen charakterisiert und bei insgesamt 25 Kindern und Jugendlichen ohne sowie 31 Kindern und Jugendlichen mit allergischen Erkrankungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie aus Blutproben quantifiziert.

Beim Vergleich von Immunzellsubpopulationen zwischen Kindern und Jugendlichen mit und ohne Allergien wurden bei vier Zellpopulationen signifikante Unterschiede gemessen: Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis wiesen mehr Gedächtnis-Effektor-T-Helfer-Zellen ($p=0,008$), mehr Gedächtnis-Th2-Zellen ($p=0,006$), und mehr Th17-Zellen ($p=0,003$) auf als Kinder und Jugendliche ohne allergische Erkrankung. Kinder und Jugendliche mit allergischem Asthma bronchiale wiesen zudem signifikant mehr myeloische dendritische Zellen Typ 2 ($p=0,008$) auf als Kinder und Jugendliche ohne Allergien.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Quantität der vorgenannten Zellpopulationen im Stadium des teilweise kontrollierten Asthma bronchiale signifikant größer war als im Stadium des kontrollierten Asthma bronchiale, was auf eine positive Assoziation der Schwere der Erkrankung mit der Zellzahl der Lymphozyten-Subpopulationen hindeutet.

Deutliche Unterschiede ergaben sich bei der vergleichenden Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen zwischen unterschiedlichen Formen von allergischen Erkrankungen. So weisen Kinder und Jugendliche mit Nahrungsmittelallergien und atopischer Dermatitis nicht die beschriebenen Veränderungen im T-Zell-Profil auf, die bei Kindern und Jugendlichen mit allergischer Rhinokonjunktivitis und allergischem Asthma bronchiale nachgewiesen wurden.

Mit Hilfe der gewonnenen Daten konnten neue Referenzwerte für aktuell identifizierte Immunzellsubpopulationen bei Kindern ohne allergische Erkrankungen ermittelt werden. Diese können zur Beurteilung der Reifung des Immunsystems und zum Vergleich bei pathologischen Immunreaktionen dienen.

V.1 Summary

In this study the immunocytological profiles of 56 children (31 children with allergic diseases and 25 control patients) were analysed in order to compare quantitative differences between healthy and allergic children, as well as to collect reference values of maturing healthy children aged 1-17. Within this experimental data collection, immunological cell populations from peripheral blood samples were identified and quantified by FACS-analysis.

Significant differences between allergic and healthy children were found in respect to Th17-cells, memory effector T-helper-cells, memory Th2-cells and myeloid dendritic cells type 2. Higher quantities of these cell populations were found in patients suffering from allergic Rhinoconjunctivitis and from allergic Asthma bronchiale, only children with allergic asthma bronchiale had higher amounts of myeloid dendritic cells type 2. Children suffering from food allergies or atopic dermatitis did not show the above mentioned differences in the T-Lymphocyte-Compartment. In addition, significantly higher numbers of these cell populations were found in the group with partially controlled allergic Asthma bronchiale compared to controlled allergic Asthma bronchiale, suggesting an association between disease severity and number of specific immune cell populations. Together, these results suggest a possible role of Th17-cells, memory effector T-helper-cells, memory Th2-cells and myeloid dendritic cells type 2 in the pathogenesis of allergic Rhinokonjunctivitis and allergic Asthma bronchiale. While the amount of Memory Th2 cells again underlines the Th2-driven immunological reaction, the immunological function and possible relevance especially for Th17-cells and myeloid dendritic cells type 2, remains to be defined.

Furthermore new reference values could be obtained for known and recently identified subsets of lymphocytes in children without allergic diseases. These data sets can be used as basic clinical data for further research.

VI Publikationen

Teile der in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden publiziert in:

Originalarbeit:

Kerzel S, Dehne J, Rogosch T, Schaub B, Maier RF, Zemlin M. (2012):
T(H)17 Cell Frequency in Peripheral Blood from Children with Allergic Asthma
Correlates with the Level of Asthma Control. J Pediatr.,161(6):1172-4

Publizierte Abstracts:

Kerzel S, Dehne J, Rogosch T, Maier RF, Zemlin M. (2012):
Der Anteil von TH17 Zellen im peripheren Blut von Kindern mit allergischem
Asthma korreliert mit dem Grad der Asthmakontrolle.
Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (GPP),
Atemwegs- und Lungenkrankheiten 38(2):58 (Posterpreis)

Kerzel S, Dehne J, Rogosch T, Maier R, Zemlin M. (2011):
Frequency of Th17-cells in peripheral blood is markedly enhanced in children with
allergic asthma. Pediatr Res., 70:S5

Dehne J, Rogosch T, Maier RF, Zemlin M, Kerzel S. (2010):
Allergische Kinder besitzen veränderte Lymphozyten-Subpopulationen.
Klin Paediatr. 2010; 222: P02

Vorträge:

Kerzel S, Dehne J, Rogosch T, Maier R, Zemlin M. Frequency of Th17-cells
in peripheral blood is markedly enhanced in children with allergic
asthma. Annual Meeting of the European Society for Pediatric Research,
Newcastle 2011

Dehne J, Rogosch T, Maier RF, Zemlin M, Kerzel S. Allergische Kinder
besitzen veränderte Lymphozyten-Subpopulationen. 59. Jahrestagung der
Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin Marburg 2010

VII Literatur

- [1] Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A. and Sallusto F. (2007): Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of Interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*, 8 (9), 942–949.
- [2] Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F. and Napolitani G. (2007): Surface phenotype and antigenic specificity of human Interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunology*, 8 (6), 639–646.
- [3] Agrawal D.K. and Shao Z. (2010): Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Current Allergy Asthma Reports*, 10 (1), 39–48.
- [4] Akbari O., DeKruyff R.H. and Umetsu D.T. (2001): Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunology*, 2 (8), 725–731.
- [5] Akdis C.A. and Akdis M. (2009): Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123 (4), 735–46.
- [6] Akdis M., Trautmann A., Klunker S., Daigle I., Kucuksezer U.C., Deglmann W., Disch R., Blaser K. and Akdis C.A. (2003): T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells. *FASEB Journal*, 17 (9), 1026–1035.
- [7] Akdis M., Verhagen J., Taylor A., Karamloo F., Karagiannidis C., Cramer R., Thunberg S., Deniz G., Valenta R., Fiebig H., Kegel C., Disch R., Schmidt-Weber C.B., Blaser K. and Akdis C.A. (2004): Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 199 (11), 1567–1575.
- [8] Akkoc T., de Koning P.J.A., Rückert B., Barlan I., Akdis M. and Akdis C.A. (2008): Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(h)1 cells as a mechanism of T(h)2 predominance in atopic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121 (3), 652–658.
- [9] Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E. and Romagnani S. (2009): Type 17 T helper cells-origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 5 (6), 325–331.
- [10] Azuma T., Takahashi T., Kunisato A., Kitamura T. and Hirai H. (2003): Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Research*, 63 (15), 4516–4520.
- [11] Banchereau J. and Steinman R.M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392 (6673), 245–252.
- [12] Barbey C., Pradervand E., Barbier N. and Spertini F. (2007): Ex vivo monitoring of antigen-specific CD4+ T cells after recall immunization with tetanus toxoid. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14 (9), 1108–1116.
- [13] Barczyk A., Pierzchala W. and Sozaska E. (2003): Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory Research*, 97 (6), 726–733.

Literatur

- [14] Beasley R. (1998): Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *The Lancet*, 351 (9111), 1225–1232.
- [15] Brucklacher-Waldert V., Stuermer K., Kolster M., Wolthausen J. and Tolosa E. (2009): Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 132 (12), 3329–3341.
- [16] Bugiani M., Carosso A., Migliore E., Piccioni P., Corsico A., Olivieri M., Ferrari M., Pirina P., Marco R. and I. S. A. Y. A. (ECRHS Italy) Study Group (2005): Allergic rhinitis and asthma comorbidity in a survey of young adults in Italy. *Allergy*, 60 (2), 165–170.
- [17] Bullens D.M.A., Truyen E., Coteur L., Dilissen E., Hellings P.W., Dupont L.J. and Ceuppens J.L. (2006): IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respiratory Research*, 7, 135.
- [18] Burgler S., Ouaked N., Bassin C., Basinski T.M., Mantel P.Y., Siegmund K., Meyer N., Akdis C.A. and Schmidt-Weber C.B. (2009): Differentiation and functional analysis of human T(h)17 cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123 (3), 588–595.
- [19] Caron G., Delneste Y., Roelandts E., Duez C., Bonnefoy J.Y., Pestel J. and Jeannin P. (2001): Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *Journal of Immunology*, 167 (7), 3682–3686.
- [20] Cella M., Facchetti F., Lanzavecchia A. and Colonna M. (2000): Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40l drive a potent Th1 polarization. *Nature Immunology*, 1 (4), 305–310.
- [21] Chehade M. and Mayer L. (2005): Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115 (1), 3–12.
- [22] Ciprandi G., Castellazzi A.M., Fenoglio D., Battaglia F. and Marseglia G. (2010): Peripheral Th-17 cells in children with allergic rhinitis: preliminary report. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 23 (1), 379–382.
- [23] Ciprandi G. and Passalacqua G. (2008): Allergy and the nose. *Clinical and Experimental Immunology*, 153 (1), 22–26.
- [24] Cosmi L., Annunziato F., Galli M.I.G., Maggi R.M.E., Nagata K. and Romagnani S. (2000): Ccr2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *European Journal of Immunology*, 30, 2972–2979.
- [25] Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. and Annunziato F. (2011): Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 66 (8), 989–998.
- [26] Cosmi L., De Palma R., Santarlasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., Gabriella Rodolico G., Querci V., Abbate G., Angeli R., Berrino L., Fambrini M., Caproni M., Tonelli F., Lazzeri E., Parronchi P., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. and Annunziato F. (2008): Human Interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *Journal of Experimental Medicine*, 205 (8), 1903–1916.
- [27] D'Ambrosio D., Iellem A., Bonecchi R., Mazzeo D., Sozzani S., Mantovani A. and Sinigaglia F. (1998): Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *Journal of Immunology*, 161 (10), 5111–5115.

Literatur

- [28] Dardalhon V., Awasthi A., Kwon H., Galileos G., Gao W., Sobel R.A., Mitsdoerffer M., Strom T.B., Elyaman W., Ho I.C., Khoury S., Oukka M. and Kuchroo V.K. (2008): IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. *Nature Immunology*, 9 (12), 1347–1355.
- [29] de Heer H.J., Hammad H., Soulli T., Hijdra D., Vos N., Willart M.A.M., Hoogsteden H.C. and Lambrecht B.N. (2004): Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *Journal of Experimental Medicine*, 200 (1), 89–98.
- [30] Duddy M., Niino M., Adatia F., Hebert S., Freedman M., Atkins H., Kim H.J. and Bar-Or A. (2007): Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*, 178 (10), 6092–6099.
- [31] Duramad P., Tager I.B. and Holland N.T. (2007): Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicology Letters*, 172 (1-2), 48–59.
- [32] Dzionek A., Fuchs A., Schmidt P., Cremer S., Zysk M., Miltenyi S., Buck D.W. and Schmitz J. (2000): BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology*, 165 (11), 6037–6046.
- [33] Evans J.G., Chavez-Rueda K.A., Eddaoudi A., Meyer-Bahlburg A., Rawlings D.J., Ehrenstein M.R. and Mauri C. (2007): Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of Immunology*, 178 (12), 7868–7878.
- [34] Frischmeyer-Guerrero P.A., Guerrero A.L., Chichester K.L., Bieneman A.P., Hamilton R.A., Wood R.A. and Schroeder J. T. (2011): Dendritic cell and T cell responses in children with food allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 41 (1), 61–71.
- [35] Fujino S., Andoh A., Bamba S., Ogawa A., Hata K., Araki Y., Bamba T. and Fujiyama Y. (2003): Increased expression of Interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52 (1), 65–70.
- [36] Gemou-Engesaeth V., Fagerhol M.K., Toda M., Hamid Q., Halvorsen S., Groegaard J.B. and Corrigan C.J. (2002): Expression of activation markers and cytokine mRNA by peripheral blood CD4 and CD8 T cells in atopic and nonatopic childhood asthma: effect of inhaled glucocorticoid therapy. *Pediatrics*, 109 (2), 24.
- [37] Glader P., Smith M.E., Malmhäll C., Balder B., Sjöstrand M., Qvarfordt I. and Linden A. (2010): Interleukin-17-producing t-helper cells and related cytokines in human airways exposed to endotoxin. *European Respiratory Journal*, 36 (5), 1155–1164.
- [38] Grindebacke H., Wing K., Andersson A.C., Suri-Payer E., Rak S. and Rudin A. (2004): Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clinical and Experimental Allergy*, 34 (9), 1364–1372.
- [39] Hagendorens M.M., Ebo D.G., Schuerwegh A.J., Huybrechts A., Van Bever H.P., Bridts C.H., De Clerck L.S. and Stevens W. J. (2003): Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children. *Clinical and Experimental Allergy*, 33 (5), 633–639.
- [40] Hammad H., Charbonnier A.S., Duez C., Jacquet A., Stewart G.A., Tonnel A.B. and Pestel J. (2001): Th2 polarization by der p 1–pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood*, 98 (4), 1135–1141.

Literatur

- [41] Hammad H., Smits H.H., Ratajczak C., Nithiananthan A., Wierenga E.A., Stewart G.A., Jacquet A., Tonnel A.B. and Pestel J. (2003): Monocyte-derived dendritic cells exposed to der p 1 allergen enhance the recruitment of th2 cells: major involvement of the chemokines tarcccl17 and mdc/ccl22. *European Cytokine Network*, 14 (4), 219–228.
- [42] Hardy R.R., Hayakawa K., Shimizu M., Yamasaki K. and Kishimoto T. (1987): Rheumatoid factor secretion from human leu-1+ B cells. *Science*, 236 (4797), 81–83.
- [43] Harris D.P., Haynes L., Sayles P.C., Duso D.K., Eaton S.M., Lepak N.M., Johnson L.L., Swain S.L. and Lund F.E. (2000): Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*, 1 (6), 475–482.
- [44] Hashizume H., Horibe T., Yagi H., Seo N. and Takigawa M. (2005): Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmacytoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis. *Journal of Immunology*, 174 (4), 2396–2403.
- [45] Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., Guo M., Mahnke K., Rivera M., Ravetch J.V., Steinman R.M. and Nussenzweig M.C. (2001): Dendritic cells induce peripheral t cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 194 (6), 769–779.
- [46] He R., Oyoshi M.K., Jin H. and Geha R.S. (2007): Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104 (40), 15817–15822.
- [47] Heaton T., Rowe J., Turner S., Aalberse R.C., de Klerk N., Suriyaarachchi D., Serralha M., Holt B.J., Hollams E., Yerkovich S., Holt K., Sly P.D., Goldblatt J., Le Souef P. and Holt P.G. (2005): An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro t-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*, 365 (9454), 142–149.
- [48] Hodgkin P.D. and Basten A. (1995): B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. *Current Opinion in Immunology*, 7 (1), 121–129.
- [49] Hunter C.A. (2005): New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology*, 5 (7), 521–531.
- [50] Hurst S.D., Muchamuel T., Gorman D.M., Gilbert J.M., Clifford T., Kwan S., Menon S., Seymour B., Jackson C., Kung T.T., Brieland J.K., Zurawski S.M., Chapman R.W., Zurawski G. and Coffman R.L. (2002): New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *Journal of Immunology*, 169 (1), 443–453.
- [51] Idzko M., la Sala A., Ferrari D., Panther E., Herouy Y., Dichmann S., Mockenhaupt M., Di Virgilio F., Girolomoni G. and Norgauer J. (2002): Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109 (5), 839–846.
- [52] ISSAC (1998): The international study of asthma and allergies in childhood: Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms. *European Respiratory Journal*, 12 (2), 315–335.
- [53] Ito T., Wang Y.H., Duramad O., Hori T., Delespesse G.J., Watanabe N., Qin F.X.F., Yao Z., Cao W. and Liu Y.J. (2005): Tslp-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through ox40 ligand. *Journal of Experimental Medicine*, 202 (9), 1213–1223.

Literatur

- [54] Jahnsen F.L., Lund-Johansen F., Dunne J.F., Farkas L., Haye R. and Brandtzaeg P. (2000): Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *Journal of Immunology*, 165 (7), 4062–4068.
- [55] Jahnsen F.L., Moloney E.D., Hogan T., Upham J.W., Burke C.M. and Holt P.G. (2001): Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*, 56 (11), 823–826.
- [56] Janeway C. A und Travers P. (1997): *Immunologie*, 2. Auflage, Spektrum-Verlag.
- [57] Kao C.Y., Chen Y., Thai P., Wachi S., Huang F., Kim C., Harper R.W. and Wu R. (2004): IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via jak and nf-kappab signaling pathways. *Journal of Immunology*, 173 (5), 3482–3491.
- [58] Karlsson M.R., Rugtveit J. and Brandtzaeg P. (2004): Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *Journal of Experimental Medicine*, 199 (12), 1679–1688.
- [59] Kawaguchi M., Kokubu F., Kuga H., Matsukura S., Hoshino H., Ieki K., Imai T., Adachi M. and Huang S.K. (2001): Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (5), 804–809.
- [60] Kearley J., Robinson D.S. and Lloyd C.M. (2008): CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122 (3), 617–624.
- [61] Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B. and Prat A. (2007): Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, 13 (10), 1173–1175.
- [62] Kerschenlohr K., Decard S., Przybilla B. and Wollenberg A. (2003): Atopy patch test reactions show a rapid influx of inflammatory dendritic epidermal cells in patients with extrinsic atopic dermatitis and patients with intrinsic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (4), 869–874.
- [63] Koga C., Kabashima K., Shiraishi N., Kobayashi M. and Tokura Y. (2008): Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (11), 2625–2630.
- [64] Kohler S. and Thiel A. (2009): Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*, 113 (4), 769–774.
- [65] Konforte D., Simard N. and Paige C.J. (2009): IL-21: an executor of B cell fate. *Journal of Immunology*, 182 (4), 1781–1787.
- [66] Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jäger A., Strom T.B., Oukka M. and Kuchroo V.K. (2007): IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(h)17 cells. *Nature*, 448 (7152), 484–487.
- [67] Kotake S., Udagawa N., Takahashi N., Matsuzaki K., Itoh K., Ishiyama S., Saito S., Inoue K., Kamatani N., Gillespie M.T., Martin T.J. and Suda T. (1999): IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 103 (9), 1345–1352.
- [68] Kuipers H., Heirman C., Hijdra D., Muskens F., Willart M., van Meirvenne S., Thielemans K., Hoogsteden H.C. and Lambrecht B.N. (2004): Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12

Literatur

- induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. *Journal of Leukocyte Biology*, 76 (5), 1028–1038.
- [69] Lack G., Fox D., Northstone K., Golding J., Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team (2003): Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *New England Journal of Medicine*, 348 (11), 977–985.
- [70] Lambrecht B.N., De Veerman M., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C., Thielemans K. and Pauwels R.A. (2000): Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 106 (4), 551–559.
- [71] Lampropoulou V., Hoehlig K., Roch T., Neves P., Calderon Gomez E., Sweenie C.H., Hao Y., Freitas A.A., Steinhoff U., Anderton S.M. and Fillatreau S. (2008): Tlr-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of Immunology*, 180 (7), 4763–4773.
- [72] Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A. and Sallusto F. (2000): Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunology*, 1 (4), 311–316.
- [73] Lanzavecchia A. (1990): Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 8, 773–793.
- [74] Lee J.H., Yu H.H., Wang L.C., Yang Y.H., Lin Y.T. and Chiang B.L. (2007): The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clinical and Experimental Immunology*, 148 (1), 53–63.
- [75] Lee J., Kuchen S., Fischer R., Chang S. and Lipsky P.E. (2009): Identification and Characterization of a Human CD5+ Pre-Naive B Cell Population. *Journal of Immunology*, 182 (7), 4116–4126.
- [76] Lim H.W., Hillsamer P., Banham A.H. and Kim C.H. (2005): Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 175 (7), 4180–4183.
- [77] Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgeon C., Dallman M., Arbery J., Carr V.A. and Robinson D.S. (2004): Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*, 363 (9409), 608–615.
- [78] Linna O., Kokkonen J., Lahtela P. and Tammela O. (1992): Ten-year prognosis for generalized infantile eczema. *Acta Paediatrica*, 81 (12), 1013–1016.
- [79] Linton P.J., Harbertson J. and Bradley L.M. (2000): A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. *Journal of Immunology*, 165 (10), 5558–5565.
- [80] Louten J., Boniface K. and de Waal Malefyt R. (2009): Development and function of Th17 cells in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123 (5), 1004–1011.
- [81] Ma C.S., Chew G.Y.J., Simpson N., Priyadarshi A., Wong M., Grimbacher B., Fulcher D.A., Tangye S.G. and Cook M.C. (2008): Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *Journal of Experimental Medicine*, 205 (7), 1551–1557.
- [82] Machura E., Mazur B., Pieniazek W. and Karczewska K. (2008): Expression of naive/memory (CD45RA/CD45RO) markers by peripheral blood CD4+ and CD8 + T cells in children with asthma. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis (Warsz)*, 56 (1), 55–62.
- [83] Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A.H. and Jonuleit H. (2002): Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*, 80 (5), 477–483.

Literatur

- [84] Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R. and Weaver C.T. (2006): Transforming growth factor-beta induces development of the T(h)17 lineage. *Nature*, 441 (7090), 231–234.
- [85] Manjarrez-Orduno N., Quach T.D. and Sanz I. (2009): B cells and immunological tolerance. *Journal of Investigative Dermatology*, 129 (2), 278–288.
- [86] Masoli M., Fabian D., Holt S., Beasley R., Global Initiative for Asthma (GINA) Program (2004): The global burden of asthma: executive summary of the gina dissemination committee report. *Allergy*, 59 (5), 469–78.
- [87] Matsuda H., Suda T., Hashizume H., Yokomura K., Asada K., Suzuki K., Chida K. and Nakamura H. (2002): Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166 (8), 1050–1054.
- [88] Matusevicius D., Kivisäkk P., He B., Kostulas N., Ozenci V., Fredrikson S. and Link H. (1999): Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 5 (2), 101–104.
- [89] Mauri C, Gray D., Mushtaq N. and Londei M. (2003): Prevention of arthritis by Interleukin 10-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197 (4), 489–501.
- [90] Mei H.E., Yoshida T., Muehlinghaus G., Hiepe F., Dörner T., Radbruch A. and Hoyer B.F. (2007): Phenotypic analysis of B-cells and plasma cells. *Arthritis Research: Methods and Protocols Volume 2*, 136, 3–18.
- [91] Meszaros G., Szalay B., Toldi G., Mezei G., Tamasi L., Vasarhelyi B., Cserhati E. and Treszl A. (2009): Foxp3+ regulatory T cells in childhood allergic rhinitis and asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 19 (3), 238–240.
- [92] Mills K.H.G. and McGuirk P. (2004): Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. *Seminars in Immunology*, 16 (2), 107–117.
- [93] Molet S., Hamid Q., Davoine F., Nutku E., Taha R., Page N., Olivenstein R., Elias J. and Chakir J. (2001): IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (3), 430–438.
- [94] Monson N.L. (2008): The natural history of B cells. *Current Opinion Neurology*, 21 (1), 3–8.
- [95] Nauta A.J., Engels F., Knippels L.M., Garssen J., Nijkamp F.P. and Redegeld F.A. (2008): Mechanisms of allergy and asthma. *European Journal of Pharmacology*, 585 (2-3), 354–360.
- [96] Neis M.M., Peters B., Dreuw A., Wenzel J., Bieber T., Mauch C., Krieg T., Stanzel S., Heinrich P.C., Merk H.F., Bosio A., Baron J.M. and Hermanns H.M. (2006): Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118 (4), 930–937.
- [97] Newacheck P.W. and Stoddard J.J. (1994): Prevalence and impact of multiple childhood chronic illnesses. *Journal of Pediatrics*, 124 (1), 40–48.
- [98] Nielsen O.H., Kirman I., Rüdiger N., Hendel J. and Vainer B. (2003): Upregulation of Interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38 (2), 180–185.

Literatur

- [99] Nisitani S., Murakami M., Akamizu T., Okino T., Ohmori K., Mori T., Imamura M. and Honjo T. (1997): Preferential localization of human CD5+ B cells in the peritoneal cavity. *Scand J Immunol*, 46(6):541–545, Dec 1997.
- [100] Niu X., He D., Zhang X., Yue T., Li, N. Zhang J.Z., Dong C. and Chen G. (2010): IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, 71 (4), 334–341.
- [101] Novak N., Peng W. and Yu C. (2007): Network of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 601, 97–104.
- [102] Nurieva R., Yang X.O., Martinez G., Zhang Y., Panopoulos A.D., Ma L., Schluns K., Tian Q., Watowich S.S., Jetten A.M. and Dong C. (2007): Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448 (7152), 480–483.
- [103] Oboki K., Ohno T., Saito H. and Nakae S. (2008): Th17 and allergy. *Allergology International*, 57 (2), 121–134.
- [104] Olson T.S., Bamias G., Naganuma M., Rivera-Nieves J., Burcin T.L., Ross W., Morris M.A., Pizarro T.T., Ernst P.B., Cominelli F. and Ley K. (2004): Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn disease. *Journal of Clinical Investigation*, 114 (3), 389–398.
- [105] Ralainirina N., Poli A., Michel T., Poos L., Andres E., Hentges F. and Zimmer J. (2007): Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 81 (1), 144–153.
- [106] Risso A., Smilovich D., Capra M.C., Baldissarro I., Yan G., Bargellesi A. and Cosulich M.E. (1991): CD69 in resting and activated T lymphocytes, its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *Journal of Immunology*, 146 (12), 4105–4114.
- [107] Rissoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R. and Liu Y.J. (1999): Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 283 (5405), 1183–1186.
- [108] Romagnani S. (2000): The role of lymphocytes in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105 (3), 399–408.
- [109] Romagnani S. (2008): Human Th17 cells. *Arthritis Research and Therapy*, 10 (2), 206.
- [110] Rothe G., Sack U., Tarnok A. (2007): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. 1. Auflage*, Karger-Verlag.
- [111] Sakaguchi S. (2004): Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22, 531–562.
- [112] Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M. and Lanzavecchia A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401 (6754), 708–712.
- [113] Sallusto F., Lenig D., Mackay C.R. and Lanzavecchia A. (1998): Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 187 (6), 875–883.
- [114] Santarlasci V., Maggi E., Capone M., Frosali F., Querci V., De Palma R., Liotta F., Cosmi ., Maggi E., Romagnani E. and Annunziato F. (2009): TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *European Journal of Immunology*, 39 (1), 207–215.

Literatur

- [115] Sanz I., Anolik J.H. and Looney R.J. (2007): B cell depletion therapy in autoimmune diseases. *Frontiers in Biosciences*, 12, 2546–2567.
- [116] Sanz I., Wei C., Eun-Hyung Lee F. and Anolik J. (2008): Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 20 (1), 67–82.
- [117] Schaumann F., Müller M., Braun A., Luettig B., Peden D.B., Hohlfeld J.M. and Krug N. (2008): Endotoxin augments myeloid dendritic cell influx into the airways in patients with allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177 (12), 1307–1313.
- [118] Schmidt-Weber C.B., Akdis M. and Akdis C.A. (2007): Th17 cells in the big picture of immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (2), 247–254.
- [119] Schmitz R., Thamm M., Ellert U., Kalcklösch M. and Schlaud M. (2014): Verbreitung häufiger Allergien bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt*, 57 (7), 771–778.
- [120] Schnyder B., Lima C. and Schnyder-Candrian S. (2010): Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine*, 50 (2), 220–227.
- [121] Schnyder-Candrian S., Togbe D., Couillin I., Mercier I., Brombacher F., Quesniaux V., Fossiez F., Ryffel B. and Schnyder B. (2006): Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *Journal of Experimental Medicine*, 203 (12), 2715–2725.
- [122] Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., Solomon M., Selby W., Alexander S.I., Nanan R., Kelleher A. and Fazekas de St Groth B. (2006): Expression of Interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203 (7), 1693–1700.
- [123] Shah K., Lee W.W., Lee S.H., Kim S.H., Kang S.W., Craft J. and Kang I. (2010): Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, 12 (2), 53.
- [124] Sicherer S.H. and Sampson H.A. (1999): Food hypersensitivity and atopic dermatitis: pathophysiology, epidemiology, diagnosis, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (32), 114–122.
- [125] Silver E., Yin-DeClue H., Schechtman K.B., Grayson M.H., Bacharier L.B. and Castro M. (2009): Lower levels of plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood are associated with a diagnosis of asthma 6 yr after severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 20 (5), 471–476.
- [126] Sly R.M. (2002): Epidemiology of allergic rhinitis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 22 (1), 67–103.
- [127] Smithgall M.D., Comeau M.R., Park Yoon B.R., Kaufman D., Armitage R. and Smith D.E. (2008): IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International Immunology*, 20 (8), 1019–1030.
- [128] Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S., Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R., Bazan F., Kastelein R.A. and Liu Y.J. (2002): Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing tslp. *Nature Immunology*, 3 (7), 673–680.

Literatur

- [129] Stone K.D. (2003): Atopic diseases of childhood. *Current Opinion in Pediatrics*, 15 (5), 495–511.
- [130] Taams L.S., van Amelsfort J.M.R., Tiemessen M.M., Jacobs K.M.G., de Jong E.C., Akbar A.N., Bijlsma J.W.J. and Lafeber F.P.J.G. (2005): Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Human Immunology*, 66 (3), 222–230.
- [131] Tang C., Inman M.D., van Rooijen N., Yang P., Shen H., Matsumoto K. and O'Byrne P.M. (2001): Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *Journal of Immunology*, 166 (3), 1471–1481.
- [132] Toda M., Leung D.Y.M., Molet S., Boguniewicz M., Taha R., Christodoulouopoulos P., Fukuda T., Elias J.A. and Hamid Q.A. (2003): Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111 (4), 875–881.
- [133] Torgerson T.R. and Ochs H.D. (2007): Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (4), 744–50.
- [134] Tosello V., Odunsi K., Souleimanian N.E., Lele S., Shrikant P., Old L.J., Valmori D. and Ayyoub M. (2008): Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs. *Clinical Immunology*, 126 (3), 291–302.
- [135] Umetsu D.T and DeKruyff R.H. (2006): The regulation of allergy and asthma. *Annual Review of Immunology*, 212, 238–255.
- [136] Upham J.W., Rate A., Rowe J., Kusel M., Sly P.D. and Holt P.G. (2006): Dendritic cell immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T-cell memory. *Infection and Immunity*, 74 (2), 1106–1112.
- [137] van Beelen A.J., Teunissen M.B.M., Kapsenberg M.L. and de Jong E.C. (2007): Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 7 (5), 374–381.
- [138] van Rijt L.S. and Lambrecht B.N. (2005): Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clinical and Experimental Allergy*, 35 (9), 1125–1134.
- [139] Varney V.A., Hamid Q.A., Gaga M., Ying S., Jacobson M., Frew A.J., Kay A.B. and Durham S.R. (1993): Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *Journal of Clinical Investigation*, 92, 644–651.
- [140] Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmby H., Westendorf A., Buer J., Martin B., Wilhelm C. and Stockinger B. (2008): Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an Interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology*, 9 (12), 1341–1346.
- [141] Venarske D. and de Shazo R.D. (2003): Molecular mechanisms of allergic disease. *Southern Medical Journal*, 96 (11), 1049–1054.
- [142] Volpe E., Touzot M., Servant N., Marloie-Provost M.A., Hupe P., Barillot E. and Soumelis V. (2009): Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood*, 114 (17), 3610–3614.

Literatur

- [143] von Mutius E. (2000): The burden of childhood asthma. *Archives of Disease in Childhood*, 82 (2), 2-5.
- [144] Wang J. and Sampson H.A. (2009): Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 1 (1), 19–29.
- [145] Wang Y.H., Ito T., Wang Y.H., Homey B., Watanabe N., Martin R., Barnes C.J., McIntyre B.W., Gilliet M., Kumar R., Yao Z. and Liu Y.J. (2006): Maintenance and polarization of human Th2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity*, 24 (6), 827–838.
- [146] Warnatz K., Denz A., Dräger R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G., Eibel H., Schlesier M. and Peter H.H. (2002): Severe deficiency of switched memory b cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood*, 99 (5), 1544–1551.
- [147] Warnatz K. and Schlesier M. (2008): Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clinical Cytometry*, 74 (5), 261–271.
- [148] Werfel T. (2009): The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129 (8), 1878–1891.
- [149] Wittmann M., Purwar R., Hartmann C., Gutzmer R. and Werfel T. (2005): Human keratinocytes respond to Interleukin-18: implication for the course of chronic inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 124 (6), 1225–1233.
- [150] Wollenberg A., Wagner M., Günther S., Towarowski A., Tuma E., Moderer M., Rothenfusser S., Wetzel S., Endres S. and Hartmann G. (2002): Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 119 (5), 1096–1102.
- [151] Wong C.K., Ho C.Y., Ko F.W., Chan C.H., Ho A.S., Hui D.S. and Lam C.W. (2001): Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and Experimental Immunology*, 125 (2), 177–183.
- [152] Wong C.K., Ho C.Y., Li E.K. and Lam C.W. (2000): Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 9 (8), 589–593.
- [153] Wong C.K., Lun S.W.M., Ko F.W.S., Wong P.T.Y., Hu S.Q., Chan I.H.S., Hui D.S.C. and Lam C.W.K. (2009): Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma. *Immunological Investigations*, 38 (7), 652–664.
- [154] Woodfolk J.A. (2007): T-cell responses to allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (2):280–294.
- [155] Wu K., Higashi N., Hansen E.R., Lund M., Bang K. and Thestrup-Pedersen K. (2000) Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Journal of Immunology*, 165 (8), 4742–4747.
- [156] Xu G., Mou Z., Jiang H., Cheng L., Shi J., Xu R., Oh Y. and Li H. (2007): A possible role of CD4+CD25+ T cells as well as transcription factor Foxp3 in the dysregulation of allergic rhinitis. *Laryngoscope*, 117 (5), 876–880.

Literatur

- [157] Yamashita K., Choi U., Woltz P.C., Foster S.F., Sneller M.C., Hakim F.T., Fowler D.H., Bishop M.R., Pavletic S.Z., Tamari M., Castro K., Barrett A.J., Childs R.W., Illei G.G., Leitman S.F., Malech H.L. and Horwitz M.E. (2004): Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4(+) effector memory cells relative to central memory cells. *Blood*, 103 (10), 3986–3988.
- [158] Yu S., Maiti P.K., Dyson M., Jain R. and Braley-Mullen H. (2006): B cell-deficient nod.h-2h4 mice have CD4+CD25+ T regulatory cells that inhibit the development of spontaneous autoimmune thyroiditis. *Journal of Experimental Medicine*, 203 (2), 349–358.
- [159] Zhao Y., Yang J., Gao Y.D. and Guo W. (2010): Th17 immunity in patients with allergic asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 151 (4), 297–307.
- [160] Zhu J. and Paul W.E. (2008): CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112 (5), 1557–1569.
- [161] Zuniga E.I., McGavern D.B., Pruneda-Paz J.L., Teng C. and Oldstone M.B.A. (2004): Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nature Immunology*, 5 (12), 1227–1234.

VIII Anhang

VIII-1 Abkürzungen

aAB	Allergisches Asthma bronchiale	MBP	Major basic protein
AD	Atopische Dermatitis	MDC	Myeloische dendritische Zelle
APC	Allophycocyanin	MHC	Major histocompatibility complex
APZ	Antigenpräsentierende Zelle	NK	Natürliche Killerzelle
AR	Allergische Rhinokonjunktivitis	NKT	Natürliche Killer-T-Zelle
BDCA	Blood dendritic cell antigen	PAF	Platelet activating factor
BMP	Bone morphogenetic protein	PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
BZ	B-Zelle	PDC	Plasmatische dendritische Zelle
BZR	B-Zell-Rezeptor	PE	Phycoerythrin
CD	Cluster of differentiation	PGE2	Prostaglandin E2
CCR	Chemokinrezeptor	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
CRTH	Chemoattractant receptor homologue	PG	Prostaglandin
CVID	Common variable immune deficiency	RAST	Radio-Allergen-Sorbent-Test
DC	Dendritische Zelle	ROR γ t	Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma t
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	SSC	Side scatter
FSC	Forward scatter	TGF	Transforming growth factor
GCSF	Granulocyte Colony stimulating factor	Th	T-Helferzelle
GMCSF	Granulocyte Macrophage Colony stimulating factor	TNF	Tumornekrosefaktor
GVHD	Graft versus host disease	Treg	Regulatorische T-Zellen
HI	Hautindex	TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
ICS	Inhalative Corticosteroide	TZ	T-Zelle
IFN	Interferon	TZR	T-Zell-Rezeptor
Ig	Immunoglobulin	VEGF	Vascular endothelial growth factor
IL	Interleukin	VPF	Vascular permeability factor
LT α	Lymphotoxin alpha		

VIII-3 Lebenslauf

VIII-4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Aumüller, Prof. Dr.	Lill, Prof. Dr.
Barth, apl. Prof. Dr.	Lohoff, Prof. Dr.
Bartsch, Prof. Dr.	Maier, Prof. Dr.
Bauer, Prof. Dr.	Maisch, Prof. Dr.
Baum, Prof. Dr.	Martin, PD
Bien, Prof. Dr.	Moll, Prof. Dr.
Cetin, Prof. Dr.	Moosdorf, Prof. Dr.
Christiansen, apl. Prof. Dr.	Mueller, Prof. Dr. Dr.
Czubayko, Prof. Dr.med.	Mutters, Prof.
Daut, Prof. Dr.	Oertel, Prof. Dr.
Donner-Banzhoff, Prof. Dr.	Opitz, Dr.
Duda, Dr.	Pagenstecher, Prof. Dr.
Eilers, Martin, Prof. Dr.	Plant, Dr.
Engenhart-Cabillic, Prof. Dr.	Renz, Prof. Dr.
Fuchs-Winkelmann, Prof. Dr.	Richter, Prof. Dr.
Gerdas, Prof. Dr.	Rosenow, Prof. Dr.
Görg, apl. Prof. Dr.	Rothmund, Prof. Dr.
Gotthardt, PD Dr.	Schade, Dr.
Grzeschik, Prof. Dr.	Schäfer, Prof. Dr.
Gross, PD Dr.	Schmidt, Dr.
Hadji, apl.Prof. Dr.	Schrader Dr.
Henzel, Dr.	Schwarz, Prof. Dr.
Hertl, Prof. Dr.	Sekundo, Prof. Dr.
Hoyer, Prof. Dr.	Seitz, Prof. Dr.
Jaques, PD Dr.	Steiniger, Prof. Dr.
Kalinowski, PD Dr.	Still, Dr.
Käuser, Dr.	Tibesku, PD Dr.
Kerzel, Dr.	Vogelmeier, Prof. Dr.
Klenk, Prof. Dr.	Wagner, Prof.
Klingmüller, Prof. Dr.	Waldegger, apl. Prof. Dr.
Klose, Prof. Dr.	Weihe, Prof. Dr.
Köhler, PD Dr.	Werner, Prof. Dr.
Koolman, Prof. Dr.	Westerman, Dr.
Krause, Prof.Dr.	Wulf, Prof. Dr.
Krieg, Prof. Dr.	Zemlin, Prof. Dr.
Kroll, Prof.Dr.	

VIII-5 Danksagungen

***Nur wenige wissen, wie viel man wissen muss, um zu wissen,
wie wenig man weiß.***

Werner Heisenberg

Ich danke der Arbeitsgruppe Pädiatrische Immunologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg herzlich für die Möglichkeit diese Arbeit fertig zu stellen, für die umfassende Unterstützung, sorgfältige Betreuung und freundliche Zusammenarbeit.

Diese Arbeit ist meinen Eltern zum Dank für ihre ständige Unterstützung und Motivation gewidmet.

VIII-6 Ehrenwörtliche Erklärung